

Aus der Abteilung
für Hämatologie und Internistische Onkologie
- Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen -
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

**Genetische Instabilität in Stammzellen der ersten
Remissionshämatopoese nach akuter myeloischer Leukämie und
ihre Auswirkung auf das „event-free-survival“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Universität Regensburg



Vorgelegt von
Michael Raffer
2012

Vorgelegt von
Michael Raffer
2012

Dekan:
1.Berichterstatter:
2.Berichterstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Prof. Dr. Albrecht Reichle
Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier
07.03.2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. .Einleitung:	9
1.1. Die akute myeloische Leukämie (AML)	10
1.2. Das myelodysplastische Syndrom (MDS)	14
1.3. Mikrosatelliteninstabilität MSI und Verlust der Heterozygotität (LOH)	17
1.4. Problemstellung und Ziele der Arbeit	18
 2. Material und Methoden	 23
2.1. Patienten- und Probenauswahl	23
2.1.1. AML-Patienten	23
2.1.2. Kontrollgruppe	30
2.2. Gewinnung der Leukaphereseprodukte zur autologen Stammzelltransplantation	32
2.3. Dichtezentrifugation mittels Ficoll Hypaque	32
2.3.1. Prinzip	32
2.3.2. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	32
2.3.3. Methodik	34

2.4. Trennung der CD34 positiven und negativen Zellfraktionen mittels MACS®	35
2.4.1. Prinzip	35
2.4.2. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	36
2.4.3. Methodik	37
2.5. Reinheitskontrolle beider Zellfraktionen mittels Durchflußzytometrie	39
2.5.1. Prinzip	39
2.5.2. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	40
2.5.3. Methodik	41
2.6. DNA-Gewinnung	42
2.6.1. Prinzip	42
2.6.2. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	42
2.6.3. Methodik	43
2.6.3.1. Zellsuspensionen	43
2.6.3.2. Gefärbte Objektträger	44
2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.7.1. Prinzip	45
2.7.2. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	46
2.7.3. Methodik	48
2.8. Fragmentlängenanalyse / Wertung von LOH, MSI und GIN	50
2.8.1. Prinzip	50
2.8.2. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	50
2.8.3. Methodik	51
2.8.4. Berechnung des LOH-Keffizienten, Wertung von LOH	51
2.8.5. Wertung von Mikrosatelliteninstabilität MSI	54

2.8.6. Definition von genetischer Instabilität (GIN)	55
2.9. Statistische Analyse der Ergebnisse	55
2.9.1. Deskriptive Statistik	55
2.9.2. Analytische Statistik	57
2.9.2.1. Abhängigkeit GIN in CD34pos.-Stammzellen der Remissionshämatopoese von Alter, LDH und zytogenetischem Risiko	57
2.9.2.2. Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier	58
2.9.2.3. Cox-Regressionsanalyse	59
3. Ergebnisse	60
3.1. AML-Patienten	60
3.1.1. Patientencharakteristik	60
3.1.2. Detektion von minimaler Resterkrankung	66
3.1.3. Vorkommen und Häufigkeit von LOH, MSI und GIN in CD34 positiver Fraktion	66
3.1.4. LOH, MSI und GIN in Knochenmarksausstrichen während der Remission	69
3.1.5. Analytische Statistik	70
3.1.5.1. Exakter Test nach Fisher	70
3.1.5.2. Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier	72
3.1.5.3. Cox-Regressionsanalyse	79
3.2. Kontrollgruppe	81
3.2.1. Patientencharakteristik	81
3.2.2. Vergleich der Chemotherapien von AML- und Kontrollgruppe	82
3.2.3. LOH, MSI und GIN in der CD34 positiven Fraktion der Kontrollgruppe	82

4. Diskussion	83
5. Zusammenfassung	88
6. Literaturverzeichnis	90
7. Lebenslauf	95
8. Danksagung	96
9. Anlage	

1. Einleitung

„Weißes Blut“ nannte Rudolf Virchow 1845 die Leukämie, ohne genaueres über Ätiologie oder Behandlung dieser Erkrankung zu wissen. In den zurückliegenden knapp 170 Jahren hat sich vieles auf diesem Gebiet getan. Viele Erkenntnisse zur Ätiologie sind gewonnen, Prognosefaktoren gefunden und Therapieschemata wurden geprüft und verfeinert.

Leukämien sind bösartige Erkrankungen, die ihren Ursprung im hämatopoetischen System haben. Es handelt sich dabei um eine ungebremsste, klonale Vermehrung von unreifen Vorläuferzellen der Blutbildung. Diese unreifen Vorläuferzellen - die Leukämieblasten - verdrängen die normale Blutbildung im Knochenmark, was für die typischen Symptome der Leukämien verantwortlich ist: Verdrängung der roten Reihe führt zur Anämie, Verdrängung der weißen Reihe zur Infektanfälligkeit und der Thrombozyten zur Blutungsneigung.¹

Leukämien sind eine Gruppe sehr uneinheitlicher Erkrankungen, die nach mehreren Faktoren eingeteilt werden.

Eingeteilt wird nach der zellulären Herkunft (lymphatisch↔myeloisch), nach der Ätiologie (primär↔sekundär) nach dem zeitlichen Verlauf (akut↔chronisch) und nach dem Differenzierungsgrad (reifzellig↔unreifzellig)¹. Akute Leukämien weisen in der Regel undifferenzierte Zellen auf, chronische eher differenzierte Zellen.

Man unterscheidet daher vier Hauptgruppen der Leukämie:

- AML (akute myeloische Leukämie)
- CML (chronische myeloische Leukämie)
- ALL (akute lymphatische bzw. lymphoblastische Leukämie)
- CLL (chronische lymphatische Leukämie), als leukämische Sonderform eines Non-Hodgkin-Lymphoms

Darüberhinaus gibt es klonale Erkrankungen der Hämatopoese, die keiner der Leukämien exakt zuzuordnen sind, aber teilweise ähnliche Merkmale aufweisen. Die große Gruppe der myelodysplastischen und myeloproliferativen Syndrome zählt dazu. Vor allem zwischen MDS und AML (morphologische Ähnlichkeit der Knochenmarksausstriche und

oft gleiche Zytogenetik) scheint es ein Kontinuum zu geben, wobei trotzdem gefordert wird, die Krankheiten zu trennen².

1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)

80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter sind AML. Die akute myeloische Leukämie zeigt zwei Altersgipfel: die frühe Kindheit und das späte Erwachsenenalter. Mit 3,7/100000 Neuerkrankungen pro Jahr und einer altersabhängigen Mortalität von 2,7 bis 18 pro 100000 gewinnt die Erkrankung gerade in der immer älter werdenden Gesellschaft immer grössere Bedeutung.³

Die Symptome resultieren wie eingangs erwähnt vor allem aus der Verdrängung gesunder Zellreihen im Knochenmark. Es handelt sich um ein akut einsetzendes Krankheitsbild. Zur Symptomatik gehören

- Allgemeinsymptome: Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß
- Anfälligkeit für bakterielle Infekte infolge Granulopenie: Entzündungen an Schleimhäuten, Candidosen
- Beschwerden aufgrund von Anämie: Blässe, Dyspnoe, Müdigkeit
- Blutungen infolge Thrombozytopenie: Petechien, bei Verbrauchskoagulopathie auch großflächigere Haut- und Schleimhautblutungen
- spezifische Symptome: z.B. hypertrophische Gingivitis (AML FAB M4 und M5)

Die Ätiologie der AML ist bis heute nicht völlig geklärt. Man vermutet ein multifaktorielles Geschehen. Für einzelne FAB-Subklassen existieren spezifische zytogenetische Befunde (siehe unten). Diese strukturellen Chromosomenaberrationen (Inversionen, Deletionen, Translokationen) führen teils zu Genprodukten, die eine Enthemmung der Zellteilung auf einem unreifen Niveau nach sich zieht. Für einen Großteil der AML (50%) liegt aber ein normaler Karyotyp vor und die molekularen Mechanismen sind damit unklar.

Die akute myeloische Leukämie kann ohne zugrunde liegende Ursache, also primär (oder de novo) auftreten, oder im Gefolge von Umständen (z. B. chron. Exposition mit Noxen) oder Grunderkrankungen (sekundäre AML).

Ursachen für sekundäre AML sind:

- Genetische Faktoren: Trisomie 21 (Down-Syndrom), Klinefelter-Syndrom (XXY)
- andere Grunderkrankungen:
 - myelodysplastische Erkrankungen
 - aplastische Anämie
 - myeloproliferative Erkrankungen (Blastenschub einer chronischen myeloischen Leukämie, Polyzythämia vera, Chronische idiopathische Myelofibrose, essentielle Thrombozythämie)
- Knochenmarksschädigungen durch:
 - Chemikalien: Benzol, Lost-Derivate, Zytostatika;
 - Ionisierende Strahlung

Zentrales Element der Diagnostik ist die mikroskopische Untersuchung des Knochenmarksausstriches nach speziellen Färbungen (May-Grünwald-Färbung, Peroxidase-Färbung, Esterase-Färbung, Eisen-Färbung, Perjodsäure-Schiff-Reaktion). Die Einteilung der AML erfolgt klassischerweise nach der FAB (French-American-British) Klassifikation, die seit ihrer Einführung 1976⁴ immer wieder modifiziert und ergänzt wurde. (siehe 2.1.1).

Ein moderner Ansatz zur Einteilung von onkologischen Krankheitsbildern ist die WHO-Einteilung der AML⁵. Bei dieser Einteilung werden neben rein morphologischen Kriterien auch genetische Aberrationen miteinbezogen:

1. AML mit definierten zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen
2. AML mit multilineärer Dysplasie (mit und ohne MDS)
3. therapieassoziierte AML
4. andere AML-Formen

Neuere Versuche der Einteilung lassen Erkenntnisse der Immunzytologie und Zytogenetik im Therapieverlauf einfließen. Ein Beispiel ist die Klassifikation der AMLCG⁶.

Der Nachweis bestimmter Oberflächenmarker unterstützt die Diagnosesicherung der Leukämie. Kombinationen dieser Marker charakterisieren die Leukämiezellen und

erleichtern deren Zuordnung zu bestimmten Zellreihen. Die gewonnene Charakterisierung der Leukämieblasten kann auch zur Remissionsbeurteilung und zur Detektion von minimaler Resterkrankung herangezogen werden.

Zellreihe	Antigen
Panmyeloisch	CD13, CD33, CD65s
granulozytär, monozytär	CD15, CD14, CD64
Vorläufer-Zellen	CD34, CD117, CD7

Tabelle 1: typische Oberflächenantigene und ihre Zuordnung zu Zellreihen⁷

Man kennt mittlerweile verschiedene Einflussfaktoren, die die Prognose der Erkrankung mitbestimmen. Das Abschätzen der Prognose ist für die Planung einer individualisierten Therapie essentiell.

Schlechte Prognose wird bestimmt durch:

- Hohes Alter und/oder schlechter Allgemeinzustand bei Diagnosestellung
- Hohe Leukozytenzahl bei Diagnosestellung
- Vorangegangene hämatologische Erkrankung (z.B. MDS, Blastenschub bei CML)
- Ungünstige Zytogenetik (Trisomie 8, Aberrationen von Chromosom 5 oder 7, t(6;9), t(9;22), 11q23-Aberrationen, komplexe zytogenetische Aberrationen)
- Sekundäre AML

Prognostisch günstige Faktoren sind:

- Promyelozyten-Leukämie (FAB M3)
- Günstige Zytogenetik: t(15;17), inv(16), t(8;21)

Grundlegendes Element der Therapie der AML ist eine intensive Chemotherapie. Sie gliedert sich nach AMLCG-92⁸ im Wesentlichen in drei Therapieblöcke:

1. Induktionstherapie nach HAM/HAM- oder TAD/HAM-Schema

2. Konsolidierungstherapie TAD-Schema

3. Erhaltungstherapie Busulfan, Cyclophosphamid mit anschließender autologer Stammzelltherapie oder monatliche Therapie mit Cytosin-Arabinosid-Chemotherapie über drei Jahre abwechselnd mit zusätzlichem Daunorubicin, Thioguanin oder Cyclophosphamid

(zu den Schemata siehe 2.1.1)

Jüngere Patienten mit histokompatiblen Geschwistern können auch nach Erreichen der ersten kompletten Remission einer allogenen Stammzelltherapie zugeführt werden.

Behandlungsablauf

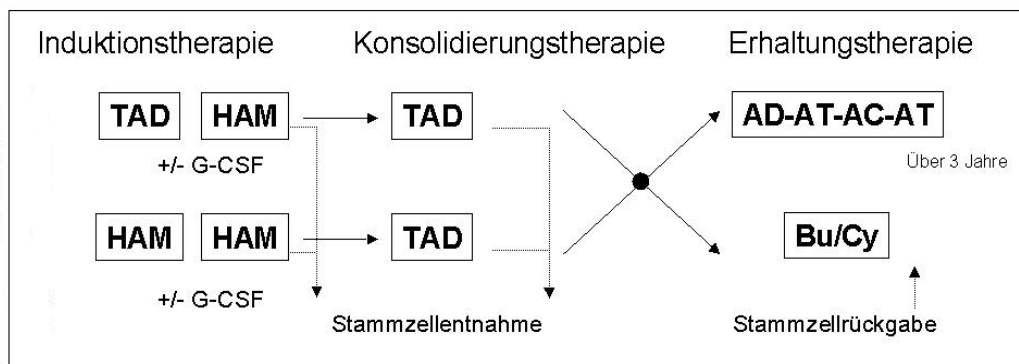


Abbildung 1: Behandlungsablauf nach AMLCG-92⁸ modifiziert

Die akute myeloische Leukämie ist eine heterogene Erkrankung, deren Prognose von den oben genannten Faktoren abhängt. Bei jüngeren Patienten kann im Rahmen der Standardtherapie eine komplette Remission in bis zu 80% der Fälle erreicht werden. Allerdings haben nur 20-30% Rezidivfreiheit über Jahre. Patienten im Alter von über 80 Jahren erreichen nur bis zu 55% eine komplette Remission mit unerfreulich niedrigen Raten von Langzeitüberleben. Unglücklicherweise ist das mediane Alter bei Diagnosestellung ca. 70 Jahre.⁹

1.2 Die myelodysplastischen Syndrome (MDS)

Bei den myelodysplastischen Syndromen handelt es sich ebenfalls um hämatologische Systemerkrankungen, die mit einem Verlust der Fähigkeit zu Ausreifung und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen einhergehen.¹⁰ Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von klonalen Stammzellenerkrankungen, die durch eine ineffektive Hämatopoese gekennzeichnet sind.

Man unterscheidet die primäre MDS von sekundären MDS-Formen, die nach Therapie oder anderweitiger Exposition mit alkylierenden oder immunsuppressiven Substanzen auftreten (auch *therapy-related* MDS, t-MDS). Das MDS ist eine Erkrankung vorwiegend des älteren Menschen, es können jedoch auch Kinder betroffen sein.¹¹

Die hämatopoetischen Stammzellen behalten bei den MDS die Fähigkeit zur Ausreifung, die ausreifenden Zellen weisen jedoch morphologische und funktionelle Defekte auf. Diese Defekte können sich in allen drei hämatopoetischen Zellreihen finden. In frühen Krankheitsstadien findet sich ein Nebeneinander von normalen und abnormalen Zellen, da sowohl normale, als auch abnormale Stammzellen aktiv sind und deren Zellnachkommen ausreifen. Die erniedrigte Zahl von reifen peripheren Blutzellen ist Ausdruck einer gesteigerten Apoptose der abnormalen Zellreihen. Dies findet seinen Ausdruck in gewöhnlich hyperzellulärem Knochenmark mit peripherer Zytopenie. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf ist die Fähigkeit zur Apoptose vermindert, der Anteil an blastären Zellen ist erhöht. Bei ca. 30% der Patienten mündet die Erkrankung in eine AML mit schlechter Prognose.¹²

Klinisch fallen die Patienten durch die Auswirkung der Zytopenien der einzelnen Zellreihen auf:

Die meist zu beobachtende Anämie führt zu Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Leistungseinschränkungen. Die quantitative und qualitative Verminderung der weißen Reihe führt zu erhöhter Infektneigung und rezidivierenden Infekten. Die Verminderung der Thrombozyten führt zu erhöhter Blutungsneigung mit dermalen Hämatomen, leicht blutenden Schleimhäuten und gastrointestinalen Blutungen.

Der Begriff der myelodysplastischen Syndrome wurde 1982 durch die French-American-British (FAB) Cooperative Group geprägt. Es wurden 5 Subtypen nach morphologischen

Kriterien unterteilt (siehe Tabelle 2).¹⁰ Die Kriterien umfassen den Blastenanteil im peripheren Blut und im Knochenmark, das Vorkommen von Ringsideroblasten und Auerstäbchen und die Anzahl der Monozyten im peripheren Blut.

Subtyp		Blastenanteil		andere Kriterien
		im peripheren Blut	im Knochenmark	
Refraktäre Anämie	RA	<1%	<5%	
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	RARS	<1%	<5%	> 15% Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Blastenexzeß	RAEB	<5%	<19%	
Refraktäre Anämie mit Blastenexzeß in Transformation	RAEB-T	>5%	20-29%	Auerstäbchen
Chronische myelomonozytäre Leukämie	CMML	<5%	<20%	>1000 Monozyten/ μ l Blut

Tabelle 2: FAB-Klassifikation der MDS

Die FAB-Klassifikation wurde 1999 von einer Arbeitsgruppe der WHO überarbeitet, um prognostischen und zytogenetischen Erkenntnissen Rechnung zu tragen.¹³

Dabei wurden die Patienten mit einem medullären Blastenanteil von über 20% den akuten myeloischen Leukämien zugeordnet. Die CMML wurde ebenfalls aus der Gruppe der

MDS ausgegliedert. Die RA und RARS der FAB-Klassifikation wurden zusammengefasst und je nach Vorkommen von Dysplasiezeichen in der granulozytären und megakaryozytären Reihe aufgeteilt in eine rein dyserythropoetische Anämie (PRA) bzw. eine Anämie mit multilineärer Dysplasie (RCMD). Beide Formen können mit oder ohne Ringsideroblasten auftreten. Als zytogenetisch definierte MDS-Untergruppe, die morphologisch sonst nicht eingeordnet werden kann, wurde das 5q-Syndrom aufgenommen. Es zeigt zwar einerseits relativ häufig einen Übergang in die AML, andererseits kann mit Lenalidomid (ein Thalidomid-Derivat) als immunmodulierenden Arzneistoff eine gute Prognoseverbesserung erreicht werden.¹⁴

Die Gruppe der RAEB wurde aufgeteilt in eine prognostisch günstigere Gruppe RAEB I mit einem medullären Blastenanteil von >5% und <10% und eine ungünstigere Gruppe RAEB II mit einem Blastenanteil von >10% und <20% im Knochenmarksaustrich.

Subtyp	Blastenanteil		Andere Kriterien
	im peripheren Blut	im Knochenmark	
PRA	<1%	<5%	nur Dyserythropoese (+/- Ringsideroblasten)
RCMD	<1%	<5%	Multilineäre Dysplasien (+/- Ringsideroblasten)
RAEB I	<5%	5-10%	
RAEB II	<5%	11-19%	
nicht klassifizierbar 5q- Anomalie	<1%	<5%	

Tabelle 3: WHO-Klassifikation der MDS

1.3 Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH; allelic imbalance, AI)

Es ist mittlerweile allgemein bekannt, dass die meisten menschlichen Krebsarten genetische Instabilitäten auf verschiedenen Ebenen aufweisen¹⁵:

- Sequenzinstabilitäten (Basenaustausch, -insertionen, -verlust; Mikrosatelliteninstabilität)
- Chromosomale Aberrationen und Allelenverlust (loss of heterozygosity)
- Genamplifikationen

Unter Mikrosatelliten (syn. **SSR** - Simple Sequence Repeats oder auch **SSLP** - Simple sequence length polymorphism) versteht man nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus oft wiederholt werden. Sie bestehen aus einer variablen Anzahl von kurzen Di-, Tri-, oder Tetranukleotidwiederholungen. Sequenziert man am Locus eines Mikrosatelliten, so erhält man Sequenzen wie "ATCATCATCATCATC...". Aufgrund ihrer hohen Variabilität und Verteilungsdichte im Genom sind die meisten Individuen bezüglich dieser polymorphen Marker heterozygot. Somit können sie zur Genanalyse verwendet werden, da die Anzahl der Wiederholungen sich bei verschiedenen Individuen unterscheidet. Nach Amplifikation mittels PCR und Fragmentlängenanalyse finden sich in gesunder DNA zwei (mütterliches und väterliches) Allele.

Mikrosatelliten sind die häufigste Form repetitiver DNA. Am häufigsten sind die Dinukleotidwiederholungen vom Typ (CA)_n. Diese machen etwa 0,5% des Genoms aus.

Normalerweise ist die Replikation ein streng kontrollierter Prozess. Ein System aus Proteinen, das mismatch repair system (MMR) entdeckt und korrigiert den Einbau von falschen Basen (mismatch) in neu hergestellten DNA-Strängen. Sind die Gene für diese Reparaturproteine (z.B. hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2) defekt, so kann es zum Ausfall des Reparatursystems kommen. Ein Symptom dieses MMR-Defizites ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Es lassen sich dann in der Fragmentlängenanalyse zusätzlich zu den elterlichen Allelen Banden bzw. Peaks nachweisen.¹⁶

Der MSI-Phänotyp wurde als erstes für das kolorektale Karzinom nachgewiesen. In ungefähr 15% der sporadischen oder HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) -Tumore ist diese Instabilität nachweisbar. Sie lässt sich ebenfalls in ca. 15% der Magen- und Endometriumkarzinome und in geringerer Verbreitung in anderen menschlichen Tumoren detektieren.¹⁷

Loss of heterozygosity (LOH) ist ein in Tumoren häufig zu findendes Phänomen. In der LOH Analyse werden ebenfalls die Mikrosatelliten herangezogen. LOH bedeutet, dass ein Allel bei ansonsten intaktem Chromosom für ein Gen verloren gegangen ist. Dies ist mit Mikrosatellitenanalyse für heterozygote Merkmalsträger gut nachweisbar. Unterscheiden sich zufälligerweise mütterliches und väterliches Allel in der Länge der Mikrosatelliten nicht, so ist dieser Genort einer LOH-Analyse nicht zugänglich.

In der Regel ist LOH in der Tumorgenese erst dann relevant, wenn Tumorsuppressorgene (TSG) betroffen sind. Diese sind normalerweise rezessiv, d.h. ein Allel reicht für die Aufrechterhaltung der Funktion aus. Die Inaktivierung beider Allele („Two hits hypothesis“ nach Knudson¹⁸) kann zu unphysiologischem, malignem Zellwachstum führen. Die Bedeutung von LOH in der Tumorgenese bei verschiedenen Tumorentitäten wurde wiederholt gezeigt.¹⁹

Das Vorkommen und die Bedeutung von LOH und MSI konnte auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden.^{20 21 22}

1.4 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Die Therapieentscheidung bei AML ist mittlerweile sehr standardisiert (s.o.). Trotzdem ist es im Einzelfall immer wieder schwierig zu entscheiden, ob man mit der allogenen Stammzelltherapie die derzeit wirksamste - wenn auch nebenwirkungsreichste – „Waffe“ gegen ein Rezidiv anwenden soll. Gerade in der größten Gruppe der Patienten mit einem mittleren zytogenetischen Risiko ist diese Entscheidung schwierig. So ist der Kliniker immer auf der Suche nach neuen, besseren Prognosefaktoren.

Klinisch tätige Mediziner berichten zudem, dass sich immer wieder die zytogenetischen Befunde der Erstdiagnose AML und die des Rezidives unterscheiden können.

Dies wirft mehrere Fragen auf:

- Existieren in einem Patienten mehrere Stammzellklone, die abwechselnd eine AML auslösen können?
- Ist das Rezidiv eine therapieassoziierte neue AML?
- Besteht ein „genetischer Flurschaden“, nämlich Dysplasien in hämatopoetischen Progenitor- und Stromazellen, die zum Entstehen einer neuen AML führt?

Diese Fragen können mit einer Forschungsarbeit sicher nicht abschließend geklärt werden. Dennoch lag die Überlegung nahe, nach genetischen Veränderungen in Form von LOH und MSI auf Stammzellebene zu suchen. Dies sollte zum Zeitpunkt einer morphologisch und zytogenetisch normalen Hämatopoese nach der Induktion einer kompletten Remission (CR) nach AML geschehen. Quelle für die DNA sollten CD34+ aufgereinigte Zellen aus Leukaphereseprodukten sein. Besonders interessant erschien dieser Ansatz, da die meisten bisherigen genetischen Analysen sich auf die AML-Blasten bezogen und nicht die „normale“ Remissionshämatopoese in den Fokus nahmen.

Wenn genetische Instabilitäten in Form von LOH und/oder MSI gefunden werden, sollte

1. ein Vergleich mit einer geeigneten Kontrollgruppe zeigen, ob diese Veränderungen durch die intensive Chemotherapie zu erklären sind, und
2. der Einfluß auf das rezidivfreie Überleben untersucht werden.

Die PCR-Primer wurden nach Literaturrecherche so gewählt, dass die untersuchten Genregionen entweder in myeloischen Erkrankungen bekanntermaßen relevant oder für die Entstehung von soliden Tumoren von Bedeutung sind.

Auswahl der Primer/Genorte

D2S123/h-MSH2

Das Genprodukt des humanen MSH2-Gens zählt zu den Proteinen, deren Funktion die Reparatur von fehlerhaft gepaarten Basen bei der Verdopplung der DNA im Rahmen der Zellteilung ist. Eine Mutation im MSH2-Gen ist an der Entstehung des hereditären kolorektalen Karzinoms ohne Polypose (hereditary non polyposis colorectal cancer, HNPCC) und anderen gastrointestinalen Malignomen beteiligt.²³ LOH (loss of heterozygosity) in der MSH2-Genregion wurde auch in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals festgestellt.²⁴

Auch bei AML-Blasten wurden bereits LOH bei MSH2 festgestellt.²⁵

APC

Das Tumorsuppressorgen APC ist wichtig für die Teilungskontrolle von Zellen. Fällt es aus, dann teilen sich die betroffenen Zellen unkontrolliert. Die Auswirkungen eines Ausfalls dieses Gens ist bekannt von der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) und dem häufig daraus entstehenden kolorektalen Karzinom.²⁶

D7S486

Die untersuchte Region 7q31.1 ist eine bekannt anfällige Region für die Entwicklung von LOH. LOH in diesem Bereich ist assoziiert mit der Aggressivität von Prostatakarzinomen²⁷. Bei myeloischen malignen Erkrankungen reicht die Schädigung in diesem Bereich von Deletionen des ganzen Chromosoms 7 bis zur LOH in einem bestimmten Genbereich. 7q31.1 gehört zu den Bereichen die des öfteren von LOH betroffen sind.²⁸

D7S525/c-Met

Das Protoonkogen c-met wird auf den langen Arm des Chromosom 7 kodiert. Es kodiert einen Thyrosinkinase-Rezeptor für einen Wachstumsfaktor, der in der Leber gebildet wird.

LOH in diesem Bereich ist unter anderem bekannt bei der Entstehung und Progression von Mammakarzinom und Magenkarzinom.^{29 30}

C-Met steht ebenfalls im Verdacht, bei verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen - auch bei der AML - eine Rolle zu spielen.³¹

D8S559/ETO

Das ETO-Gen auf dem Chromosom 8 ist bei AML bekannt durch das Translokationsprodukt AML1-ETO bei der Translokation t(8;21). t(8;21) spielt eine bedeutende Rolle in der Leukämieentwicklung.³²

D11S1356/MLL

Das „mixed lineage leukemia“-Gen (MLL-Gen) ist in der Leukämiediagnostik bekannt aus zytogenetischen Befunden. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, sind auch subchromosomale Veränderungen an diesem Genort häufig, sowohl bei AML der Erwachsenen³³, als auch bei akuten Leukämien der Kinder³⁴.

MFD15 (D17S250)/BRCA1

Mutationen im BRCA1-Gen sind seit langem bekannte Risikofaktoren für familiäre Brustkrebserkrankungen, aber auch für Ovarialkarzinome. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass neben diesen auch Magen-, Bauchspeicheldrüsen- und Prostatakrebs mit dem familiären Auftreten von BRCA1 vergesellschaftet sein könnten³⁵.

TP53ALS/p53

p53 ist als Wächter des Genoms bekannt.³⁶ Es ist ein 53kD Protein, das als Tumorsuppressorgen wirkt. Bei DNA-Schäden werden unter Mitwirkung von p53 als Transkriptionsfaktor vermehrt Gene exprimiert, die an Apoptose, Kontrolle des Zellzyklus und DNA-Reparatur beteiligt sind.

p53 ist in nahezu 50% aller menschlichen Tumore mutiert. Auch bei Leukämien sowohl der myeloischen, als auch der lymphatischen Reihe sind p53-Mutationen beschrieben.³⁷

Primer	Chromosomenregion	Involvierte Genregion
D2S123	2p16	h-MSH2
APC	5q21 - 22	APC
D7S486	7q31.1	unbekannt
D7S525	7q22 - 31.1	c-met
D8S559	8q22	ETO
D11S1356	11q23	MLL
MFD15	17q11.2 - 12	BRCA 1
TP53ALS	17p12 - 13.1	p53

Tabelle 4: verwendete Primer und zugehörige Chromosomenregion und Genorte

2. Material und Methoden

2.1 Patienten- und Probenauswahl

2.1.1 AML-Patienten

Für diese Arbeit wurden 61 Patienten mit de-novo AML oder sekundärer AML (AML aus MDS) ausgewählt, bei denen eine autologe periphere Blutstammzelltransplantation (im Folgenden: auto-PBSZT) im Rahmen einer standardisierten Studientherapie durchgeführt worden ist, beziehungsweise vorgesehen war. Es bestanden keine Selektionskriterien bezüglich Alter, Karyotyp der Blasten bei Diagnose, LDH oder anderen bekannten Prognosefaktoren. Die Auswahl der Patienten orientierte sich an der Verfügbarkeit von Reservebeuteln mit Aphereseprodukten und der Einwilligung der Patienten zur wissenschaftlichen Nutzung. Ausgeschlossen wurden Patienten mit primärer allogener Blutstammzelltransplantation.

Alle Patienten wurden gemäß einem Pilotstudienprotokoll der AMLCG-92⁸ Studie behandelt, die eine auto-PBSZT als Postremissionstherapie beinhaltet. Sie erhielten als Doppelinduktionstherapie das TAD-HAM-Schema: Thioguanin, Cytarabin (Ara-C) und Daunorubicin (TAD) in einem ersten Zyklus, gefolgt von Hochdosistherapie mit Ara-C und Mitoxantron (HAM).

Sechs Tage nach Ende der Induktionszyklen wurde die Ausschwemmung von Blutstammzellen mit einer täglichen subkutanen Injektion mit G-CSG (granulocyte-colony-stimulating factor) ins periphere Blut stimuliert. Die Konsolidierungstherapie bestand aus Busulfan und Cyclophosphamid mit anschließender auto-PBSZT beziehungsweise einer Konsolidierung mit TAD und Langzeiterhaltungstherapie.

Therapieplan TAD:

100 mg/m ²	Ara-C	kontinuierliche intravenöse (iv.) Infusion	Tag 1 und 2
100 mg/ m ²	Ara-C	iv. Infusion über 30 min alle 12 Stunden	Tag 3 bis 8
60 mg	Daunorubicin	iv. Infusion über 30 min täglich	Tag 3 bis 5
100 mg/m ²	Thioguanin	orale Medikation alle 12 Stunden	Tag 3 bis 9

Therapieplan HAM:

3 g/m ²	Ara-C	iv. Infusion über 3 Std. alle 12 Stunden	Tag 1 bis 3
10 mg/m ²	Mitoxantron	iv. Infusion über 30 min. täglich	Tag 3 bis 5

Therapieplan auto-PBSZT als Konsolidierung:

4 mg/kg	Busulfan	orale Medikation täglich	Tag -9 bis -6
60 mg/dg	Cyclophosphamid	iv. täglich	Tag -5 bis -2
auto-PBSZT			Tag 0

Untersucht wurden nicht mehr benötigte Reservebeutel des gewonnenen Aphereseproduktes für die auto-PBSZT. Die Aphereseprodukte wurden gemäß standardisierten Bedingungen im Rahmen der klinischen Routine gewonnen. Zeitpunkt der Gewinnung war der Abschluss der Induktionstherapie und Erreichen der ersten kompletten Remission.

Parallel wurden von 47 der 61 AML-Patienten gefärbte Knochenmarksausstriche auf Objektträgern untersucht. Nach DNA-Gewinnung wurden mit dem selben Primer-Paneel mittels PCR LOH und MSI gesucht. Der Zeitpunkt der Entnahme war wie bei der Stammzellapherese die erste komplette Remission. (siehe unten)

Zytomorphologie

Die Untersuchung der Zytomorphologie wurde im Rahmen der Routinediagnostik von Knochenmarksaspiraten und -stanzen an der Klinik für Hämatologie und Onkologie an der Klinik der Universität Regensburg durchgeführt. Standardmäßig wurde May-Grünwald-Färbung, Peroxidase-Färbung, Esterase-Färbung, Eisen-Färbung und Perjodsäure-Schiff-Reaktion gemäß standardisierten Bedingungen³⁸ angewandt.

Alle Knochenmarksausstriche wurden gemäß der diagnostischen Routine untersucht und eine Zählung der Blasten mit Bestimmung des prozentualen Anteils vorgenommen.

Die zytomorphologische Einteilung der Blasten erfolgte nach WHO-Kriterien³⁹.

Die Morphologie der Blasten wurden gemäß der French-American-British (FAB) Cooperative Group folgenden Gruppen zugeordnet:¹

FAB-Klassifikation	AML-Unterform/Subtyp	Typische Zytogenetik
FAB M0	Akute myeloische Leukämie (= Myeloblastenleukämie) mit minimaler Differenzierung	
FAB M1	Akute myeloische Leukämie (= Myeloblastenleukämie) ohne Ausreifung	
FAB M2	Akute myeloische Leukämie (= Myeloblastenleukämie) mit Ausreifung	t(8;21)
FAB M3	Akute Promyelozytenleukämie (APL) mit starker Granulation	t(15;17)
FAB M3v	APL-Variante (mikrogranulär)(APLv)	t(15;17)
FAB M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	
FAB M4Eo	Akute myelomonoblastäre Leukämie mit eosinophilen Granulozyten	inv (16)
FAB M5a/b	Akute monozytäre/monoblastäre Leukämie (=Monoblastenleukämie)	
FAB M6a/b	Akute Erythro-Leukämie (=Erythroblastenleukämie) mit/ohne myeloiden Anteilen	
FAB M7	Akute megakaryozytäre Leukämie (=Megakaryoblastenleukämie)	

Tabelle 5: FAB-Klassifikation der AML

Zytogenetik

Die zytogenetischen Untersuchungen wurden im Rahmen der diagnostischen Routine am Labor für spezielle Leukämie-Diagnostik, III: Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern, München, durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Leukämie-Referenzlabor gemäß AMLCG-92.

Die zytogenetischen Daten wurden gemäß der internationalen Nomenklatur für humane Zytogenetik klassifiziert⁴⁰. Die zytogenetischen Befunde wurden in Untergruppen mit guter, mittlerer und schlechter Prognose eingeteilt.¹

Risikogruppe	Zytogenetik
1 = günstige Prognose	t(8;21)(q22,q22) t (15;17)nb inv(16)(p13q22)
2 = mittleres Risiko	Normaler Karyotyp -Y
3 = ungünstige Prognose	-5/del(5q) -7/del(7q) 11q23 (MLL) Rearrangement inv(3)(q21,q26) t(3;3)(q21,q26) ins(3;3) 17q-Abnormalitäten komplex aberranter Karyotyp (≥3 Aberrationen)

Tabelle 6: Zytogenetische Befunde und Risikogruppen

Immunphänotypisierung und Detektion von minimaler Resterkrankung (minimal residual disease, MRD)

Zusätzlich zu zytomorphologischen und zytogenetischen Untersuchungen wurden verschiedene Oberflächenmarker der Leukämiezellen zum Zeitpunkt der Diagnose untersucht, um die Tumorzellen näher zu charakterisieren. Dies geschah im Rahmen der diagnostischen Routine bei allen Patienten mit der Diagnose AML. Die Charakteristika der Leukämieblasten wurden zur Detektion von MRD in den Leukaphereseprodukten verwendet.

Zur Untersuchung mittels Durchflußzytometrie - durchgeführt vom Institut für klinische Chemie und Labormedizin am Klinikum der Universität Regensburg - wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper in festen Kombinationen verwendet, die sich zur Detektion von MRD bewährt haben⁴¹:

- HLA-DR/CD14/CD45
- CD8/CD4/CD3
- CD7/CD1a/CD2
- CD10/CD5/CD19
- CD65/CD33
- CD34/CD13/CD20
- CD41/glycophorinA
- CD42b/CD15
- kappa/lambda/CD19
- IgM/CD22/CD3
- MPO/IgM

Klinische Definition der kompletten Remission (complete remission, CR)

Für alle Patienten wurde eine einheitliche, anerkannte Definition für eine komplette Remission angewandt⁴². Zur Diagnose einer kompletten Remission nach AML gehörten:

- normale Hämatopoese in allen Zelllinien im Knochenmarksausstrich
- weniger als 5% Blasten im Knochenmarksausstrich
- mindestens 1500/ μ l neutrophile Granulozyten im peripheren Blutbild

- mindestens 100 000/ μ l Thrombozyten im peripheren Blutbild

Die Knochenmarksausstriche wurden wie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gefärbt (s.o.).

Tabelle 7: Zusammenfassung AML-Patienten

Nr.	AML-Typ	Alter bei Diagnose	Chromosomale Aberrationen	Karyo-Risk	LDH-Werte U/L	Leukozyten/nl
1	M3	46	t(15;17), i(17q) ,+8	3	1188	7,5
2	M1	54	+6,+8,+mar E	3	293	2,79
3	M2	44	49 XX,+g,+8,+12/36 XX	3	k. D.	k. D.
4	M2	49	Trisomie 8, del(7)q	3	468	35
5	M2	44	-7	3	444	21
6	M4	38	keine Daten verfügbar	k. D.	564	50,7
7	M2	54	t(8;21)	1	1664	38
8	M4	60	normaler Karyotyp	2	324	19,7
9	M4	62	normaler Karyotyp	2	174	3
10	M1	63	normaler Karyotyp	2	"normal"	20,7
11	undifferenziert	17	normaler Karyotyp	2	250	0,93
12	M4	41	del(20)q + weitere	3	259	3
13	Daten nicht verfügbar	54	komplexer männl. Karyotyp	3	271	5,3
14	M0	63	normaler Karyotyp	2	280	9
15	M5	58	+13	2	349	255
16	M2	34	normaler Karyotyp	2	497	55,3
17	M3	47	t(15;17), (q22;q21)	2	258	0,99
18	M2	37	t(8;21), del(9)(q21)	2	235	5
19	M1	47	t(8;21)	1	950	63
20	M0	35	normaler Karyotyp	2	170	1,76
21	M2	59	del(6)(q21)	2	207	0,97

Material und Methoden

22	M6	36	hyperdiploid, 48-69XY,+ weitere	3	520	1,86
23	M1	56	keine Daten verfügbar	k. D.	1038	72
24	M0	46	der(3), komplex	3	324	21,76
25	M5	31	der(4)t, del(9),s	3	559	3
26	M5	32	t(9;11)	2	1499	167
27	M2	42	-X, t(8;21)	2	1032	27,1
28	M2	59	del(5), komplex	3	891	21
29	M5	29	+4, der(10)	3	544	5
30	M2	34	normaler Karyotyp	2	1256	90
31	M0	57	normaler Karyotyp	2	533	17
32	M0	42	normaler Karyotyp	2	"normal"	0,81
33	M4	21	-Y, t(8;21)(q22,q22)	1	1068	43
34	M5	48	normaler Karyotyp	2	823	14,95
35	M4	50	normaler Karyotyp	2	431	53,05
36	M4	54	normaler Karyotyp	2	441	29
37	M5a	55	der(10),11q23/MLL	2	523	k. D.
38	Daten nicht verfügbar	40	normaler Karyotyp	2	118	1,6
39	M2	43	del(7)q	3	"normal"	2
40	M1	32	t(1;3), komplex	3	600	12
41	M1	37	t(6;21)	2	173	1
42	M5a	41	t(8;16)(p11,p13)	2	671	9
43	M2	31	keine Daten verfügbar	k. D.	726	45
44	M2	52	normaler Karyotyp	2	k. D.	k. D.
45	M5a	38	t(9;11), MLL-Re	2	525	1,38
46	M4	59	normaler Karyotyp	2	439	72,5
47	undifferenziert	62	21p+/-21	2	k. D.	2,3
48	M4	33	normaler Karyotyp	2	1884	139
49	M2	52	t(1;7)(p36,p11)	2	254	1,45
50	M2	16	t(8;21)	1	1210	26

51	M4eo	58	inv(16)	1	731	27,81
52	M2	63	+6	2	"normal"	2
53	M4	30	normaler Karyotyp	2	580	79
54	M1	43	normaler Karyotyp	2	436	17,6
55	M5	60	MLL-Rearrangement	2	1301	6
56	M5a	50	normaler Karyotyp	2	<700	k. D.
57	M2	38	normaler Karyotyp	2	565	31
58	M5	45	normaler Karyotyp	2	321	32
59	M4eo	20	inv(16),CBT β -MY/+11	1	329	6,54
60	M1	49	normaler Karyotyp	2	844	87
61	M1	44	normaler Karyotyp	2	300	1,76

2.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe diente eine Gruppe von 28 Patienten, die ebenfalls nach einer intensiven tumorreduktiven Chemotherapie (siehe Tabelle 8) bei verschiedenen malignen Erkrankungen eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender auto-PBSZT erhielten. Selektionskriterien waren in dieser Gruppe die Art der Vortherapie und die Verfügbarkeit von zur Untersuchung freigegebenen Leukaphereseprodukten neben der Einwilligung der Patienten zur wissenschaftlichen Nutzung.

Nr.	Diagnose	Chemotherapien vor Stammzellapherese
1	AFP+-Hodenkarzinom	4xPEP, 1xPEI
2	B-NHL	6xRituximab/CHOP, 1xRituximab/VIPE
3	B-NHL	4xCHOP/Mabthera, 1CHOEP
4	B-NHL	5xCHOEP, 1xVIPE/Mabthera
5	B-NHL	5xCHOP, 4xMabthera
6	B-NHL	4xCHOP14/Rituximab, 1xCHOEP/Rituximab
7	B-NHL	7xCHOEP, 2xVIPE, 1xMabthera

Material und Methoden

8	B-NHL	6xCHOP, 1xVIPE
9	B-NHL, Mantelzell-Lymphom	2xRibomustin/Fludarabin, 6xFludarabin/Endoxan, 1xEndoxan-Etoposid
10	B-NHL/Seminom	B-ALL-Studie: 1x BlockA, 2xBlockB, 3xPEB, 4xHD-MTX, 1xHD-AraC
11	follikuläres NHL	6xCHOP, 1xVIPE
12	Großzell-NHL	6xCHOEP, 1xMabthera/VIPE
13	IgA-kappa Plasmozytom	10xIdarubizin, Dexamethason, 1xIEV
14	M.Hodgkin	2xCHOP/ABVD, 6x
15	M.Hodgkin	4xBEACOPP, 1xVIPE
16	M.Hodgkin	8xCHOP, 6xABVD, 1xCEP, 1xVIPE
17	M.Hodgkin	4xDoppelzyklus ABVD, 1xVIPE
18	Mantelzell-Lymphom	8xCHOP, 1xVIPE+Rituximab
19	Ewing-Sarkom, metastasiert	1xVIDE
20	Ewing-Sarkom	4xVIDE
21	NHL	6xCHOP, 1xVIPE
22	NHL	3xCHOP, 1xHD-Carboplatin, Etoposid, Treosulfan
23	NHL	6xCHOP21, 1xVIPE/Mabthera
24	NHL	8xCHOP/6xG-CSF, 1xVIPE/Mabthera
25	NK-Zell-Lymphom	4xCHOP, 1xCHOEP
26	plasmoblast.-NHL	6xCHOP, 1xVIPE
27	Plasmozytom	6xVincristin/Adriamycin/Dexa, 6xVinorelbin/Idarubicin/Dexa, 2x Endoxan, VP16, 1xEpirubicin/Ifosphamid/VP16

Tabelle 8: Kontrollgruppe; Diagnosen und Therapien vor Stammzellapherese

2.2 Gewinnung der Leukaphereseprodukte zur autologen Stammzelltransplantation

Die Gewinnung von mit Blutstammzellen angereicherten Leukaphereseprodukten aus dem peripheren Blut gelingt nach Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark über Apheresegeräte. Diese arbeiten nach dem Prinzip der Differentialzentrifugation (Prinzip siehe 2.3.1).

Die Gewinnung der Leukaphereseprodukte erfolgte im Rahmen der klinischen Routinediagnostik. Die Mobilisation der Blutstammzellen aus dem Knochenmark wurde mit der Gabe von G-CSF nach der Induktionstherapie bei der AML-Gruppe, bzw. nach den Mobilisationschemotherapien bei der Kontrollgruppe erreicht. Die Leukaphereseprozedur erfolgte gemäß des Standardprotokolls der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universität Regensburg mit dem Apheresegerät Cobe Spectra Apheresis system, München, Deutschland. Während einer Apherese wurde ein gesamtes Blutvolumen von 10-20 Litern bei einem kontinuierlichen Fluss von 50-70 ml/min prozessiert. Die Apherese wurde gestartet, wenn die Konzentration der CD34 positiven Zellen mindestens $3 \times 10^3/\text{ml}$ im peripheren Blut betrug. Die Apherese wurde täglich in ein bis vier aufeinanderfolgenden Tagen vollzogen. Durchschnittlich waren 2,1 Apheresen pro Patient und Mobilisationszyklus nötig, um die nötige Menge an CD34+ Stammzellen zu gewinnen.

Das Aphereseprodukt wurde gemäß Standardbedingungen der o.g. Abteilung nach Reinheitskontrolle und Ausschluß von Kontamination mit leukämischen Blasten mittels FACS mit DMSO konserviert und bis zur Re-Transplantation bzw. sonstigen Verwendung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.3 Dichtezentrifugation mittels Ficoll Hypaque

2.3.1 Prinzip

Die Dichtezentrifugation mittels einer Ficoll-Lösung einer definierten Dichte nützt Dichteunterschiede verschiedener Zellpopulationen aus. Die Zellsuspension wird auf die Ficoll-Lösung geschichtet. Bei ungebremster Zentrifugation wandern nun dichtere Zellen durch die Ficoll-Lösung. Weniger dichte Zellen (z.B. mononukleäre Zellen, je nach eingesetzter Ficoll-Dichte) sammeln sich oberhalb der Ficoll-Schicht aber unterhalb der

eingesetzten Pufferlösung (siehe Abbildung). Der „buffy coat“ aus mononukleären Zellen kann dann mittels Pipette abgesammelt werden.

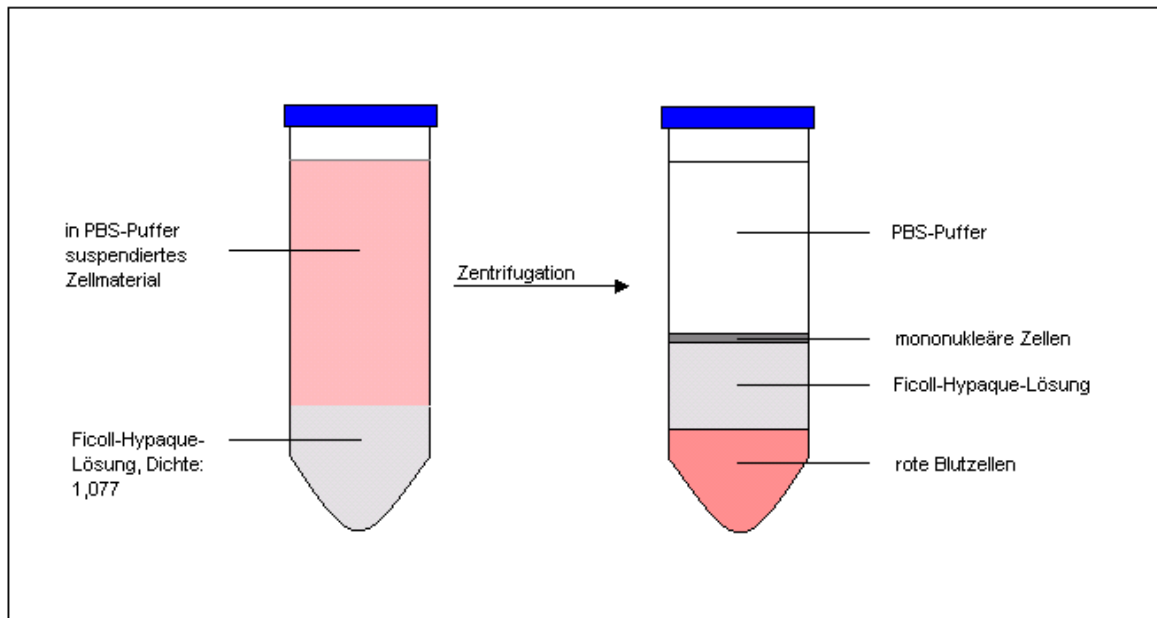


Abbildung 2: Prinzip der Ficoll-Dichtezentrifugation

2.3.2 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

- Sterilbank
Clean Air, Modell Ca/REVS 4
Clean Air Deutschland GmbH
Hilden, Deutschland
- Zentrifuge
Megafuge 1.0, Heraeus Depa Tech,
Heraeus, Hanau, Deutschland
- Mikroskope
Leica, Wild MPS 52, Wetzlar, Deutschland
- Zählkammer
Neubauer improved, Tiefe 0,100 mm,
Marienfeld, Deutschland
- Pipettierhilfen
Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl, Eppendorf
300

Mehrfachpipette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipetboy accu, IBS Integra Biosciences, Walliselle, Schweiz

- Zentrifugenröhrchen: 50 ml Falcon Nr. 2070, Becton Dickinson Labware, USA
- Koagelfilter 70µm Falcon, Becton Dickinson Labware, USA
- Pipettenspitzen
ungestopft: Sarstedt, Nümbrecht
- PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Sigma, Deisenhofen
- FCS Fetal Calf Serum, GIBCO
- DNase 100 IU/ml, Roche
- Biocoll Dichte 1,077, Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
- Trypanblau trypan blue solution (0,4%), Sigma Deisenhofen

2.3.3 Methodik

1. Auftauen der Beutel im Wasserbad bei 37°C
2. Überführen des Beutelinhaltes in Falcon Zentrifugationsröhrchen 50ml
3. Zentrifugation 1300U/min für 7min, ungebremstes Auslaufen der Zentrifuge
4. Waschen der Zellen: Abkippen des Überstandes, Zellpellet resuspendieren und auffüllen mit 50ml PBS-Puffer, der mit 2% FCS (fetal calf serum) versetzt wurde (PBS/2%FCS), erneute Zentrifugation bei 1300U/min für 7 Minuten, Abkippen des Überstandes, Zellpellet resuspendieren
5. Zugabe von 1 ml DNase-Lösung und 10ml PBS/2%FCS-Lösung - Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 10 Minuten
6. Waschen der Zellen (siehe 3. + 4.)
7. Zellsuspension filtern: Überführen der Zellsuspension auf 70µm Filter, Fa. Falcon (siehe oben) in neues 50ml Falcon-Laborröhrchen, Spülen des gebrauchten Röhrchens und des Filters im neuen Röhrchen mit 50ml PBS/2%FCS
8. Waschen der Zellen (siehe 3. + 4.)
9. Ficoll-Dichtezentrifugation

9.1 Resuspendierte Zellen mit 40 ml PBS-Puffer auffüllen

- 9.2 neues 50ml Röhrchen, Nr. 2070, Fa. Falcon (siehe oben), mit 10ml Biocoll-Lösung auffüllen
- 9.3 Zellsuspension auf Biocoll-Lösung schichten
- 9.3 ungebremste Zentrifugation bei 2000U/min für 25 Minuten
- 9.4 Abpipettieren der mononukleären Zellschicht und Überführen in neues 50ml Röhrchen (siehe oben), Auffüllen mit 50 ml PBS-Puffer
- 10. Zweimaliges Waschen der Zellen (siehe 3. und 4.) bei 1800 U/min für sieben Minuten mit PBS-Puffer
- 11. Waschen der Zellen (siehe 3. und 4.) bei 1200 U/min für 7 Minuten mit PBS-Puffer
- 12. Auffüllen der resuspendierten Zellen mit 15ml PBS/2%FCS - Aufbewahrung im Kühlschrank
- 13. Färben eines Aliquots (20µl) der Zellsuspension mit 20µl 0,4% Tryptan-Blau-Lösung
- 14. Zählen der nicht gefärbten – lebendigen - Zellen in einer Neubauer Zählkammer

2.4 Trennung der CD34 positiven und negativen Zellfraktionen mittels MACS®

Um die gewonnenen mononukleären Zellen, also überwiegend Lymphozyten, Monozyten und Stammzellen in CD34 positive (CD34+) Stammzellen und CD34 negative (CD34-) Lymphozyten/Monozyten aufzutrennen, fand das MACS®-System Anwendung.

2.4.1 Prinzip

MACS® (magnetic activated cell separation) ist eine schnelle und effiziente Methode zur oberflächenspezifischen Zellseparation und nützt magnetisch markierte Antikörper für die Separation aus⁴³. Die aufzureinigende Zellpopulation muß sich dafür durch ein spezifisches Antigenepitop auf der Zelloberfläche auszeichnen (hier CD34-Antigen). Dieses Antigen wird durch einen magnetisch markierten Antikörper besetzt werden und

somit wird die antigenträgende Zelle insgesamt magnetisiert. Die gewaschene Zellsuspension wird über eine in einem starken Magnetfeld befindliche Säule aufgetragen. Nicht markierte Zellen (hier überwiegend Lymphozyten) können aus der Säule ausgewaschen werden. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die markierten Zellen (hier CD34 positive Blutstammzellen) aus der Säule mit Druck eluiert werden (siehe Abbildung).⁴⁴

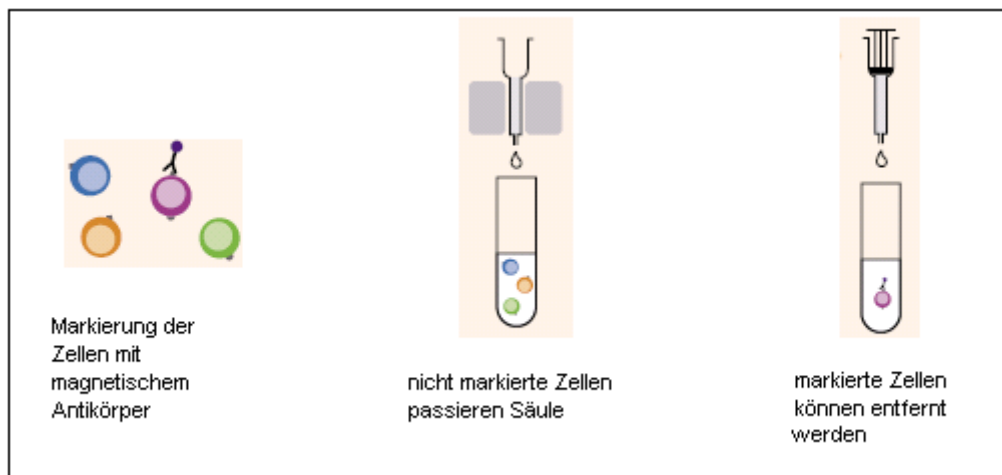


Abbildung 3: Prinzip der Positivaufreinigung mittel MACS® Separation Columns

Verwendetes Säulensystem: je nach Zellzahl MACS MS oder LS Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland. Bei Gesamtzellzahlen bis 2×10^8 Zellen MS Säulen und mini-MACS Separator, bei mehr als 2×10^8 jedoch weniger als 2×10^9 Zellen LS Säulen und Midi-MACS Separator.

2.4.2 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

- Sterilbank
Clean Air, Modell Ca/REVS 4
Clean Air Deutschland GmbH
Hilden, Deutschland
- Zentrifuge
Megafuge 1.0, Heraeus Depa Tech,
Heraeus, Hanau, Deutschland
- Mikroskope
Leica, Wild MPS 52, Wetzlar, Deutschland
- Zählkammer
Neubauer improved, Tiefe 0,100 mm,
Marienfeld, Deutschland

- Pipettierhilfen Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl, Eppendorf 300
Mehrfachpipette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy accu, IBS Integra Biosciences, Walliselle, Schweiz
- Sammelröhrchen 5 bzw. 13 ml, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland;
- Pipettenspitzen
ungestopft: Sarstedt, Nümbrecht
- MACS Separation Columns MS oder LS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Pre-Separation-Filer 30µm, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Cryo Tube 1,8ml Nunc A/S, Dänemark
- FcR-Blocking-Agent Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- CD34 Micro Beads Klone: QBEND10, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland,
- PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Sigma, Deisenhofen
- FCS Fetal Calf Serum, Gibco
- Trypanblau trypan blue solution (0,4%), Sigma, Deisenhofen

2.4.3 Methodik

1. Aufbewahrte Zellsuspension bei 1300 U/min zentrifugieren, Überstand abkippen und Zellpellet resuspendieren
2. Zugabe von FcR-Blocking Reagent, 100µl Reagenz für 1×10^8 Zellen; Inkubationszeit: 1 Minute
3. Zugabe von CD34 Micro Beads, Klone: QBEND10, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, 100µl Reagenz für 1×10^8 Zellen

4. Inkubation im Kühlschrank für 30 Minuten
5. Waschen der Zellen: Auffüllen des Röhrchens mit 50ml PBS/2%FCS, Zentrifugation bei 1300 U/min für sieben Minuten, Abkippen des Überstandes
6. Zellen resuspendieren mit PBS/2%FCS-Lösung, 500µl Puffer pro 1×10^8 Zellen
7. MACS Separation Column im entsprechenden Magneten einlegen
8. Vorspülen der MACS Separation Column mit 500µl (MS-Säulen) oder 3ml (LS Säulen) PBS/2%FCS-Lösung
9. Auftragen der resuspendierten Zellen in 500µl Portionen über einen Pre-Separation Filter 30µm, Milenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland; Simultanes Auffangen der nicht-markierten Zellen in frischem Probengefäß
10. Spülen der Säule mit 3x500µl (MS-Säulen) oder 3x3ml PBS/2%FCS-Puffer, Simultanes Auffangen der nicht-markierten Zellen in frischem Sammelröhrchen
11. Messen der Zellzahl der nicht-markierten Zellen mittels Trypanblaufärbung und Verwendung einer Neubauer Zählkammer
12. MACS-Säule aus dem Magneten nehmen, 5ml PBS/2%FCS-Lösung auf die Säule geben und das in der Säule befindliche CD34 positive Zellmaterial mit Druck unter Verwendung des beigefügten Stempels in ein neues Sammelröhrchen pressen, Vorgang wiederholen zur Erhöhung der Zellzahl
13. Erhaltene Suspension zentrifugieren bei 1300 U/min für sieben Minuten, Abkippen des Überstandes, resuspendieren der Zellen, bestimmen der Zellzahl (siehe 11.)
14. Entnahme eines Aliquots beider Zellfraktionen zur Reinheitskontrolle mit FACS (siehe unten)
15. Zellen kryokonservieren in 90%FCS/10%DMSO - Lösung bei -80°C in geeigneten Schraubröhrchen

2.5 Reinheitskontrolle beider Zellfraktionen mittels Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrische Analyse für die vorliegende Arbeit wurde im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität Regensburg durch eingewiesenes Personal durchgeführt.

2.5.1 Prinzip

Bei der FACS-Messung werden in Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt. Durch gezielte Bestrahlung mit Laserlicht und Analyse des entstehenden Streulichtes können Aussagen über die Beschaffenheit jeder einzelnen Zelle getroffen werden. Für die Analyse werden das Vorwärtsstreulicht FSC (engl. forward scatter) und das Seitwärtsstreulicht SSC (engl. side scatter) herangezogen. Das FSC gibt dabei Auskunft über die Zellgröße, das SSC über die Granularität, das heißt über die Größe des Zellkerns und die Dichte der anderen Zellorganellen.

Durch vorherige Markierung der Zelloberfläche mit fluoreszierenden Antikörpern können gleichzeitig durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser die Ausprägung verschiedener Oberflächenmerkmale der einzelnen Zellpopulationen gemessen werden⁴⁵.

Das Protokoll zur Zählung von CD34 pos. Vorläuferzellen beinhaltet eine Gegenfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD45. CD45 ist ein allgemeiner Leukozytenmarker. Dies erlaubt eine Diskriminierung von CD34 pos. Vorläuferzellen, die nur wenig CD45 exprimieren und nur ein geringes Seitwärtsstreulicht aufweisen (CD34+, CD45 dim, SSC low). Ebenfalls ermöglicht dieses Protokoll eine Messung der anderen Leukozyten, die CD45 im hohen Maß exprimieren.

Dieser Meßaufbau für die Zählung von CD34 pos. Zellen wurde vom Institut für Klinische Medizin und Labormedizin am Klinikum der Universität Regensburg etabliert und entspricht den Richtlinien der ISHAGE⁴⁶ (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) und der EWGCA⁴⁷ (European Working Group on Clinical Cell Analysis).

2.5.2 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

- Coulter® EPICS®
XL-MCL Durchfluß-Zytometer Beckman-Coulter
- ADVIA-120® Hämatologie-Meßsystem, Bayer
- 12x75 mm test tubes, PE Falcon 352053. Becton Dickinson Labware, USA
- Pipettierhilfen Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl, Eppendorf 300 Mehrfachpipette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Pipetboy accu, IBS Integra Biosciences, Walliselle, Schweiz
- Pipettenspitzen ungestopft: Sarstedt, Nümbrecht
- DPBS-Puffer Dulbecco's modified phosphate buffered saline w/o $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$; Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
- FCS Fetal Calf Serum, Gibco
- R-Phycoerythrin (PE) Becton Dickinson Labware, USA
- konjugierter antiCD34-mAB in korrekter Verdünnung zum Erhalt einer (Klone 8G12) CD34 mAB Sättigungskonzentration
- PE-Cy5-konjugierter I/O Test Inc., USA
- anti-CD45 mAB in korrekter Verdünnung zum Erhalt einer (Klon: J33) CD45 mAB Sättigungskonzentration
- Flow-CountTM Fluorospheres Beckman Coulter, USA
- fluoreszierende Mikrosphären
- 10x NH_4Cl Lyse-Lösung Beckman Coulter, USA

2.5.3 Methodik

1. Messung der Leukozytenzahl (ADVIA-120), Herstellen einer Verdünnung der Probe mit DPBS/2%FCS auf 2×10^7 Zellen/ml
2. Verwenden von zwei PE-Probengefäßen je Probe, Doppelmessung
3. 100µl der Probe in die Probengefäße geben
4. Zugabe von 10 µl CD45-PECy5 mAB und 20 µl CD34-PE mAB zu jedem Probengefäß, vorsichtiges Mischen.
5. Abgedunkelte Inkubation auf Eis für 20 Minuten
6. Zugabe von 2 ml einer 1x NH₄Cl lysing solution (10fach verdünnt mit sterilem destilliertem Wasser) zu jedem Probengefäß, vorsichtiges vortexen.
7. Abgedunkelte Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten
8. Kurz vor der Messung Zugabe von 100µl Flow-Count Lösung in jedes Probengefäß
9. Messung mit Coulter® EPICS® XL-MCL Durchfluß-Zytometer. Messung von mindestens 100000 Zellen in jedem Probengefäß
10. Einstellung des Gerätes und Wahl der Gating-Strategie nach Gratama *et al.*⁴⁶ und Keeney *et al.*⁴⁸.
11. Analyse: Bestimmung der gezählten Events in den Gates für Flow-Count Mikrosphären, CD45⁺ (→ Leukozyten) and CD34⁺ events (→ CD34 positive Vorläuferzellen).
12. Berechnung der absoluten Zellzahlen nach dem folgenden Schema:

13. Zellzahl = $\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Mikrosphären}} \times \text{Flow-Count Konzentration}$

14. Berechnung der absoluten Zellzahl in der gesamten Probe. Bildung eines Durchschnittswertes aus der Doppelmessung unter Beachtung der Vorverdünnung
15. Bestimmung der Reinheit (d.h. der Effizienz der CD34 Selektion):
16. Gesamt-CD45 positive Zellen: 100%
17. CD34⁺ cell count: % of total CD45⁺ leukocyte count

War der Anteil der CD34 positiven Zellen <80% (20/61 bei AML-Gruppe; 3/28 bei Kontrollgruppe) bei der positiv selektionierten Probe, bzw. >5% (5/61 bei AML-Gruppe, 0/28 bei Kontrollgruppe) bei der negativ selektionierten Probe, dann wurde noch einmal eine Positiv- beziehungsweise Negativselektion durchgeführt (analog 2.4.2). Auf eine erneute Messung der Reinheit wurde dann verzichtet, da dann die Gefahr eines größeren Zell- und damit DNA-Verlustes gegeben war.

Die Reinheit der Probe lässt sich anhand der angehängten Untersuchung von einem zweifachen Durchlauf (Anlage 1), die bei der Herstellerfirma der MACS®-Säulen angefertigt wurde, abschätzen.

Die erhaltenen Zellproben wurden als Quelle für Stammzell-DNA bei den CD34pos Zellen bzw. für konstitutionelle DNA (überwiegend Lymphozyten) bei den CD34neg Zellen verwendet.

2.6 DNA-Gewinnung

2.6.1 Prinzip

Die DNA-Isolierung mittel Säulensystemen wie QIAamp Mini Kit ® erfolgt in folgenden Schritten:

1. Zelllyse (Puffer AL/ATL, Proteinase und Ethanol)
2. Absorption von DNA an für DNA spezifischer Silika-Membran
3. Auswaschen von Verunreinigungen von der Membran (Puffer AW1 und AW2)
4. Durch Änderung des Milieus eluieren der DNA von der Membran (Puffer AE)

2.6.2 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

- Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus Depa Tech, Hanau, Deutschland
- Vortexer Genie 2, Scientific Inc., Bohemia, N.Y., USA
- Pipettierhilfen Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl
- Thermomixer
- Zentrifugenröhrchen 50 ml Falcon Nr. 2070, Becton Dickinson Labware, USA
- QIAamp DNA Micro Kit QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

bestehend aus

- DNA-Präparationssäulen
- Sammelröhrchen 2ml
- Proteinase K (>600 mAU/ml)
- Puffer ATL (Tissue Lysis Buffer)
- Puffer AL (Lysis Buffer)
- Puffer AW1 und AW2 (Wash Buffer)
- Puffer AE (Elution Buffer)

- Pipettenspitzen
ungestopft: Sarstedt, Nümbrecht
- Reaktionsgefäße 2ml Eppendorf, Wesseling, Deutschland
- Reaktionsgefäße 1,5ml Safe-Lock, Eppendorf, Wesseling, Deutschland
- Ethanol 96%

2.6.3 Methodik

2.6.3.1 Zellsuspensionen

Arbeitsplan

1. Auftauen der gefrorenen Proben in 50ml PBS/2%FCS Lösung in 50ml Falcon-Zentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur
2. Zentrifugation bei 1300 U/min für 7 Minuten, Abkippen des Überstandes
3. Waschen der Zellen: resuspendieren des Zellpellet, auffüllen mit 50ml PBS/2%FCS Lösung, Zentrifugation bei 1300 U/min für 7 Minuten, abkippen des Überstandes
4. Resuspendieren des Zellpellet, überführen der Zellsuspension in 2ml Reaktionsgefäß, spülen des Zentrifugenröhrchens in 50µl Portionen bis ca. 100-150µl Gesamtvolumen erreicht sind
5. Versetzen mit 20µl Proteinase K
6. Zufügen von 200µl Puffer AL

7. Vortexen für 15 Sekunden, anschließend Inkubation im Thermomixer bei 56°C und 900U/min für zehn Minuten, kurzes Zentrifugieren, um Tropfen von der Innenseite des Verschlusses zu entfernen.
8. Zugabe von 200µl Ethanol
9. Vortexen für 15 Sekunden, anschließend Inkubation bei Raumtemperatur für drei Minuten, kurzes zentrifugieren, um Tropfen von der Innenseite des Verschlusses zu entfernen
10. Überführen des Inhaltes des Reaktionsgefäßes auf eine DNA-Präparationssäule. Die Präparationssäule vorher auf ein Sammelröhrchen stecken
11. Zentrifugation bei 8000U/min für 1 Minute
12. Verwerfen des Sammelröhrchens; die Präparationssäule auf ein neues Sammelröhrchen stecken
13. Zugabe von 500µl Puffer AW1
14. siehe 11. + 12.
15. Zugabe von 500µl Puffer AW2
16. siehe 11. + 12.
17. Die Präparationssäule auf ein neues Sammelröhrchen stecken
18. Zentrifugation bei 11000 U/min für fünf Minuten, um Säulenmembran zu trocknen
19. Die Präparationssäule auf ein neues, verschließbares Sammelröhrchen stecken
20. Zugabe von 100µl Puffer AE
21. Zentrifugation bei 11000U/min für 5 Minuten, um DNA zu eluieren

2.6.3.2 gefärbte Objektträger

1. Puffer ATL und Proteinase K im Verhältnis 10:1 mischen (z. B. 4ml ATL + 400 µl Proteinase K reicht für 20 Objektträger), vortexen
2. 210 µl dieser Mischung auf einen Objektträger geben
3. Kurz anlösen lassen, mit Pipettenspitze abkratzen, Flüssigkeit wieder aufsaugen und in Reaktionsgefäß geben
4. Mit Skalpellklinge Reste der Gewebespuren abkratzen und zusammenschieben. Reste auf Klinge in Reaktionsgefäß geben

5. 20µl Puffer ATL auf die Gewebespuren geben, aufsaugen und in Reaktionsgefäß geben
6. Reaktionsgefäße für 15 Sekunden vortexen
7. anschließend Inkubation im Thermomixer bei 56°C und 900U/min für zehn Minuten, kurzes Zentrifugieren, um Tropfen von der Innenseite des Verschlusses zu entfernen
8. ab Schritte 6. bis 17. gleiche Arbeitsweise wie für Zellsuspensionen (siehe oben)
9. Zugabe von 70µl Puffer AE
10. Zentrifugation bei 11000U/min für 5 Minuten, um DNA zu eluieren

2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.7.1 Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein hocheffizientes und hochspezifisches Verfahren um genau definierte Abschnitte von DNA zu amplifizieren und so nachzuweisen, beziehungsweise weiteren Analysen zuzuführen⁴⁹. Die Eingrenzung der Abschnitte geschieht mittels Primer. Darunter versteht man DNA-Abschnitte mit einer Basenabfolge, die komplementär zur Basenfolge der Anfangs- bzw. Endstrecken der zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte sind.

Die PCR gliedert sich in verschiedene Einheiten, die durch die Wahl der Reaktionstemperatur vorgegeben werden⁵⁰:

1. **DNA- Denaturierung:** Die doppelsträngige Original-DNA wird in Einzelstränge aufgetrennt. Dieser Prozess wird auch als „melting“ (engl.: schmelzen) bezeichnet. Die entstandenen Einzelstränge dienen im Folgenden als Matrix für die Produktion von Kopien der Original-DNA. Das Reaktionsgemisch wird dazu auf 92°C aufgeheizt.
2. **Anheften der Primer:** Dieser Teil des PCR-Zyklus wird auch als „annealing“ (engl.: fixieren) bezeichnet. Die Primer binden jeweils bei für sie spezifischen Temperaturen an die vorgesehene Zielregion bedingt durch Länge und Sequenz der Primer. In der Regel liegt die annealing-Temperatur zwischen 55 und 65°C.
3. **Elongation:** Eine thermostabile Polymerase, die in der Regel aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt (Taq-Polymerase), füllt die Stränge mit freien Nukleotiden, die dem Reaktionsansatz beigemischt sind mit der Ursprungs-DNA als

Matrize auf. Je nach verwendeter Polymerase wird hierzu eine Temperatur von 68 bis 72°C eingestellt.

Erst durch die Verwendung einer thermostabilen Polymerase konnte die PCR selbständig in einer Maschine ablaufen, da nicht nach jeder Denaturierung und Primer-Anheftung die Polymerase neu hinzugegeben werden musste.

2.7.2 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

- | | |
|------------------------------|--|
| • Pipettierhilfen | Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl,
Eppendorf 300 |
| • 8er-Strips | Biozym, Oldendorf, Deutschland |
| Reaktionsgefäße 0,5ml | |
| • Pipettenspitzen, gestopft: | Biozym, Oldendorf, Deutschland |
| • MgCl | Roche, Mannheim |
| • dNTP | Roche, Mannheim |
| • TAG-Polymerase | Roche, Mannheim |
| • PCR Puffer | Roche, Mannheim |
| • Primer | Metabion (Martinsried)
Applied Biosystem ,Darmstadt und
Genset SA, Paris |
| • Wasser für HPLC | Neolap, Heidelberg |

Primer		Primersequenz
D7S486	Forward primer	5'-(6-Fam)-AAAGGCCAATGGTATATCCC-3'
	Reverse primer	5'-GCCCAGGTGATTGATAGTGC-3'
D7S525	Forward primer	5'-(6-Fam)-GTTAGCCGAGATTGCCC-3'
	Reverse primer	5'-CTTGCTGTTTAAGTACCACAAGTTC-3'
D8S559	Forward primer	5'-(Hex)-AATTGAAGTGAGGTAGGAGGTTG-3'
	Reverse primer	5'-AGCTATTGCTCTTACAGGAGGG-3'
D11S1356	Forward primer	5'-(Hex)-GTTGCTCATCTGTTGCTCA-3'
	Reverse primer	5'-ACCTGCCCTGACTTGC-3'
TP53ALS	Forward primer	5'-(6-Fam)-TCGAGGAGGTTGCACTAAGCGGA-3'
	Reverse primer	5'-AACAGCTCCTTTAATGGCAG-3'
D2S123	Forward primer	5'-(6-Fam)-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3'
	Reverse primer	5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'
APC	Forward primer	5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCG-3'
	Reverse primer	5'-(Hex)-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'
Mfd15 (D17S250)	Forward primer	5'-(Ned)-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3'
	Reverse primer	GCTGGCCATATATATATTTAAACC

Tabelle 9: Sequenzen der eingesetzten Primer

2.7.3 Methodik

1. Vorbereitung des Arbeitsplatzes (siehe oben)
2. Herstellung des „Master-Mixes“, z. B. für 10 Reaktionen (siehe Tabelle 10), alle Reagenzien auf Eis gelagert
3. Pipettieren von 1,5µl Proben-DNA in 8er-Strips Reaktionsgefäße
4. Zufügen von 28,5µl „Master-Mix“ pro Probe
5. Reaktionsgefäße in PCR-Cycler geben, Programm kontrollieren (siehe unten) und starten

	µl	End-konz	Einheit	Stammlösung	Einheit
H₂O	211,2				
DMSO	15,0	5	%	100	%
MgCl₂	18,0	1,5	mM	25	mM
10 x Rx-Puffer	30	1	x	10	
dNTPs	6,0	0,2	mM	10	mM
Primer1	3,6	0,3	µM	25	µM
Taq-Pol	1,2	0,02	U/µl	5	U/µl
total	285,0				
add	28,5	µl Lsg.	to 1,5	µl template DNA	

Tabelle 10: Beispiel eines PCR-Reaktionsansatzes für TP53ALS - fluoreszenzmarkiert

Besonderheiten der Handhabung

Die PCR ist ein hochsensibles Verfahren zur Vermehrung von DNA-Abschnitten. Daher ist sie aber auch sehr anfällig für Verunreinigung durch Fremd-DNA. Ein absolut sauberes Arbeiten ist daher Voraussetzung für das Gelingen der Analytik.

Wegen der Anfälligkeit des PCR-Verfahrens ist eine besondere Infrastruktur für den Ansatz der Reaktionslösung nötig, um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden⁵¹. Separate Arbeitsplätze für den Ansatz der PCR und strikte Trennung vom „Post-PCR“-Bereich ist oberstes Gebot. Der Arbeitsplatz wird zusätzlich vor Beginn der Arbeit wischdesinfiziert. Das Tragen von Einmalhandschuhen ist obligat. Alle Reagenzien und das verwendete Wasser müssen DNA-frei sein und für jeden Ansatz werden die Reagenzien neu geöffnet oder aliquotiert.

Zur Kontrolle von möglichen Verunreinigungen wurde bei jedem PCR-Ansatz ein Reaktionsgefäß mit Wasser und Master-Mix (siehe unten) mit in das PCR-Gerät gegeben (Negativkontrolle). Zur Kontrolle der Reaktionsfähigkeit des Master-Mixes und des Gerätes wurde eine Probe mit bekannt hochwertiger DNA ebenfalls in das PCR-Gerät gegeben (Positivkontrolle)

Das PCR-Gerät ist gemäß den oben beschriebenen Einheiten in Temperatur- und Zeitabläufe programmiert. Es wurden jeweils 30 PCR-Zyklen durchlaufen.

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	92°C	2min
2	Denaturierung	92°C	1min
3	Primer-Annealing	60°C (je nach Primer)	1min
4	Elongation	72°C	1min
5	abschließende Elongation	72°C	8min

Tabelle 11: Programmierungsbeispiel für PCR-Cycler, 30x Wiederholung der Schritte 2-4

2.8 Fragmentlängenanalyse / Wertung von LOH, MSI und GIN

2.8.1 Prinzip

Die Analyse der PCR-Produkte, welche sich wegen Mikrosatelliten-Polymorphismen interindividuell in ihrer Länge unterscheiden, erfolgte durch eine automatische

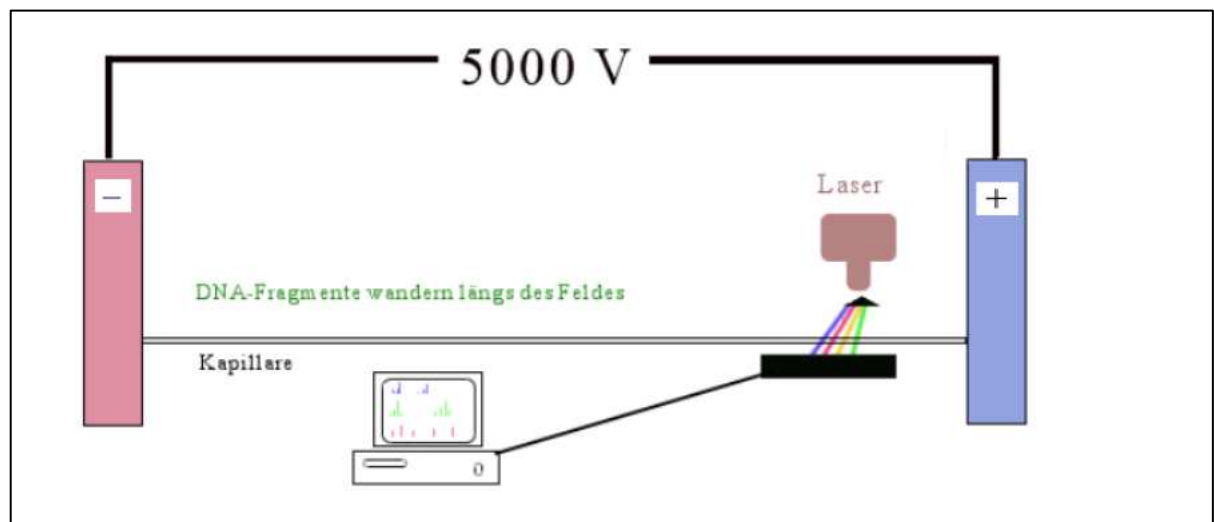


Abbildung 4: Fragmentlängenanalyse mit fluoreszierenden Primern in einer Gelkapillare; Schema

Fragmentanalyse mittels Kapillar-Elektrophorese im System ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer. Die PCR-Produkte werden im System elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Fluoreszenzmarkierung der Primer werden die PCR-Produkte für das lasergestützte Detektionssystem zur Analyse zugänglich.

Simultan wird ein mit rotem Farbstoff markierter interner DNA-Längenstandard (Genescan Rox 400 ®) zugefügt, der zur Längenmessung der PCR-Produkte benötigt wird.

Diese Werte werden EDV-gestützt verglichen. Die Ergebnis-Ausgabe erfolgt in Form von farbigen Kurven und von Tabellen, die Länge und Intensität (in Form der Peakhöhe) der gemessen „Peaks“ angeben.

2.8.2 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

- ABI Prism®3100 AVANT Genetic Analyzer Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland
- Pipettierhilfen Eppendorf Reference, 10/100/1000 µl,

Eppendorf 300

- Pipettenspitzen
ungestopft: Sarstedt, Nümbrecht
- 96er Well-Platte Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland
- Hidi Formamid Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland
- Genescan Rox 400 Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland

2.8.3 Methodik

1. Die PCR-Produkte werden zu je 1µl auf 6er Well-Platten übertragen.
2. Versetzen der Proben mit 12µl Hidi-Formamid und 0,7µl Genescan Rox 400
3. Gründliches Vermischen der Lösung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren
4. automatisiertes Laden der Proben in den ABI Prism®3100 AVANT
5. Erstellen einer elektronischen Belegungsliste im Auswertungsprogramm des ABI Prism®3100 AVANT

2.8.4 Berechnung des LOH-Koeffizienten, Wertung von LOH

Zur Vermeidung von Auswertungsfehlern wurde eine rechnerische Auswertung der vom ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer gelieferten Daten vorgenommen. Dazu wurden die Verhältnisse der Hauptpeaks der beiden Allelen in der untersuchten Probe mit dem Verhältnis der Hauptpeaks der konstitutionellen DNA verglichen. Der Quotient dieser beiden Verhältnisse liefert im Normalfall idealerweise den Wert 1.

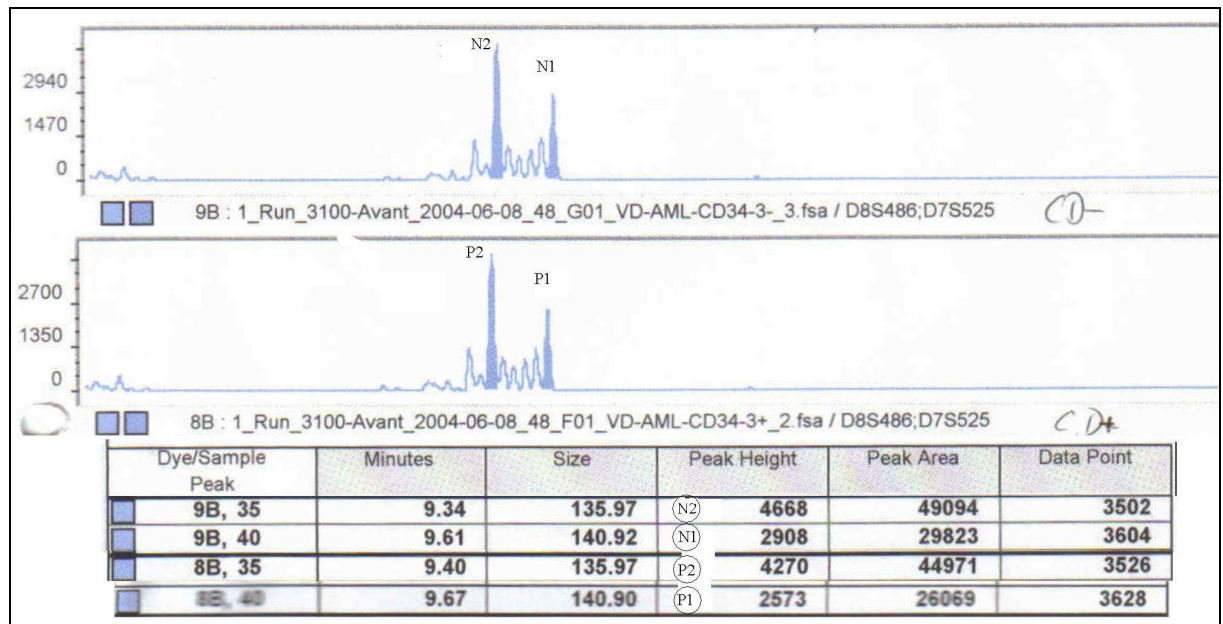


Abbildung 5: Beispiel für Normalbefund; AIF ca. 1

$$\text{LOH-Koeffizient} = \frac{N1/N2}{P1/P2} = \frac{2908/4668}{2573/4270} = 1,03$$

Formel 1: Normalbefund, siehe Abbildung 3

Sonderfall:

Haben beide Allele dieselbe Anzahl an Mikrosatelliten-Repeats, so können sie vom Detektor nicht unterschieden werden. Diese Proben wurden bezüglich LOH als „nicht informativ“ gewertet. Die Mikrosatelliten können als stabil gewertet werden. Beispiel:

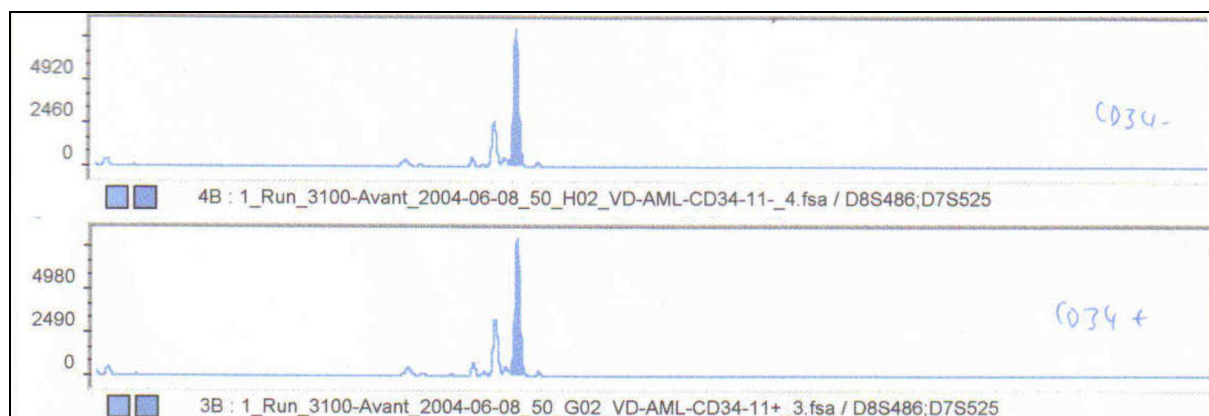


Abbildung 6: Beispiel für Mikrosatellitenstabilität, bezüglich LOH nicht informativ; „MSS ni“

Je mehr sich das Verhältnis der Peaks der untersuchten Probe von dem Peakverhältnis der konstitutionellen DNA unterscheidet, umso weiter entfernt sich der LOH-Koeffizient vom Wert 1.

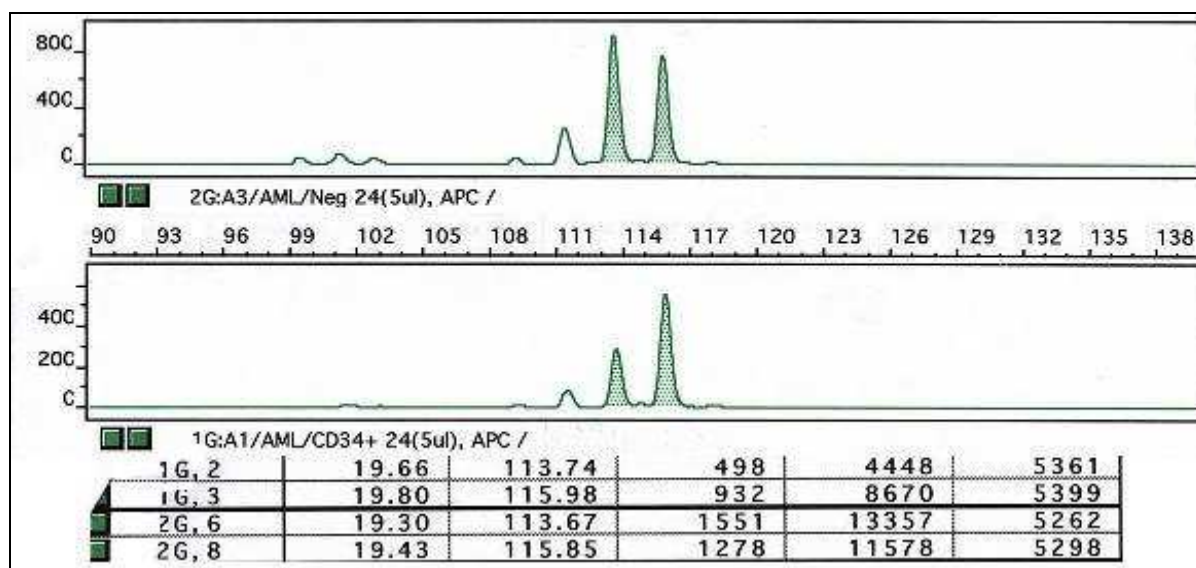


Abbildung 7: Beispiel für LOH

$$\text{LOH-Koeffizient} = \frac{N1/N2}{P1/P2} = \frac{932/498}{1278/1551} = 2,27$$

Formel 2: LOH, siehe Abbildung 5

In der Literatur werden LOH-Koeffizienzen $>2/<0,5$ bei besonders reinen Zellpopulationen als Kriterium für das Vorliegen eines LOH gewertet.⁵² Bei mehr heterogenen Zellpopulationen wurden auch LOH-Koeffizienzen von $>1,42/<0,7$ als LOH-Kriterium verwendet.^{53 54}

Da nicht davon auszugehen ist, dass es sich bei den abgesammelten hämatopoetischen Stammzellen um einen einzigen Zellklon handelt, muss von einer polyklonalen Zellpopulation ausgegangen werden. Daher wurden für diese Untersuchung die „schwächeren“, aber auch sensibleren LOH-Koeffizienten von $>1,42/<0,7$ verwendet.

2.8.5 Wertung von Mikrosatelliteninstabilität, MSI

MSI wurde gewertet, wenn reproduzierbar eine oder mehrere zusätzliche Peaks in der zu untersuchenden Probe auftauchen, die in der Negativkontrolle nicht zu finden sind.

Beispiel:

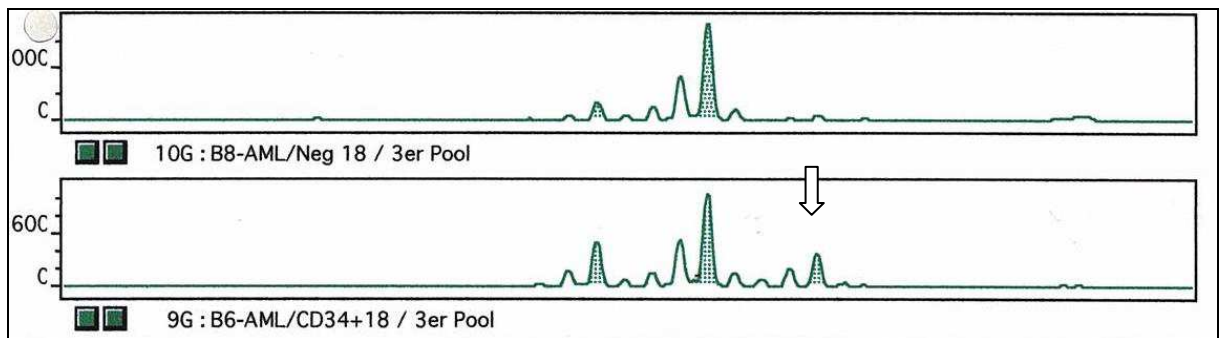


Abbildung 8: MSI, zusätzlicher Peak (siehe Pfeil)

Die PCR und die Fragmentlängenanalyse wurden für jede primär auffällige Probe ein zweites Mal durchgeführt, um das Risiko von falsch positiven Ergebnissen zu minimieren.

2.8.6 Definition von genetischer Instabilität „GIN“

Als genetisch instabil gelten in dieser Untersuchung Proben mit

1. zwei oder mehr LOHs bei den untersuchten Genorten
2. MSI in einem oder mehr der untersuchten Genorten
3. LOH am D8S559-Lokus

2.9 Statistische Analyse der Ergebnisse

2.9.1 Deskriptive Statistik

Die folgenden Charakteristika wurden mit einer großen bekannten AML-Patientengruppe der Veröffentlichung von Haferlach et al.⁵⁴ verglichen, um die Annahme der Repräsentativität zu stützen.

Alter

Zum Vergleich mit der Kontrollgruppe wurde das Merkmal Alter in Altersgruppen eingeteilt. Die Altersgruppen umfassten das Alter 0 bis 20, 21 bis 30, 31 bis 40, 41 bis 50, 51 bis 60, 61 bis 70 und über 70. Die Zugehörigkeit der untersuchten Patienten wurde gezählt und die Häufigkeiten in jeder Gruppe als Anteil der gesamten untersuchten Gruppe dargestellt. Zum Vergleich mit anderen Patientengruppen (siehe oben) wurden Altersgruppen \leq und $>$ 50 Jahre gebildet. Simultan erfolgte eine Bestimmung des arithmetischen Mittels und des Median des Alters der Gesamtgruppe.

FAB-Klassifikation

Die Zugehörigkeit zu den einzelnen FAB-Subklassifikationen wurde gezählt. Die Anzahl der jeweiligen Patienten in den einzelnen Subklassifikationen wurde als Anteil in Prozent von der Gesamtgruppe dargestellt.

Zytogenetik

Gemäß den Kriterien in 2.1.1 wurden die zytogenetischen Befunde in drei Gruppen eingeteilt: 1=günstiges Risiko, 2=mittleres Risiko, 3=ungünstiges Risiko. Der Anteil der

Patienten in den jeweiligen Gruppen wurde als Anteil in Prozent von der Gesamtgruppe dargestellt.

Blastenanteil bei Erstdiagnose

Wie in größeren Untersuchungen beschrieben⁵⁴ wurde der Blastenanteil zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in zwei Gruppen eingeteilt: unter 75% Blasten im Knochenmark bzw. 75% und mehr. Der Anteil der Patienten in den jeweiligen Gruppen wurde als Anteil in Prozent von der Gesamtgruppe dargestellt.

Serum-LDH bei Erstdiagnose

Wie in größeren Untersuchungen beschrieben⁵⁴ wurde das Serum-LDH zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in zwei Gruppen eingeteilt: bis zu 700 U/l bzw. mehr als 700U/l. Der Anteil der Patienten in den jeweiligen Gruppen wurde als Anteil in Prozent von der Gesamtgruppe dargestellt.

Darstellung des Therapieerfolges

Die Patienten wurden in erster Linie eingeteilt in

- primär allogene transplantierte Patienten,
- Patienten, bei denen nach zwei Chemotherapiezyklen (siehe 2.1.1) eine komplette Remission erreicht wurde, und
- Patienten, bei denen dies nicht gelang.

Die erzielten primären kompletten Remissionen wurden dann weiter eingeteilt in stabile Remissionen im Beobachtungszeitraum, in Rezidive und in neu aufgetretene MDS.

Die Gruppen wurden jeweils mit absoluten Werten und mit prozentualen Anteilen an der Gesamtgruppe dargestellt.

Vorkommen und Häufigkeit von LOH und MSI

Untersucht wurde die Häufigkeit von LOH und MSI in absoluten Werten und in prozentualen Anteilen bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Genloci, patientenübergreifend auf die einzelnen Genloci und patientenbezogen auf alle acht Genloci. Darüberhinaus wurde die Häufigkeit von GIN nach der Definition in 2.8.6 untersucht.

2.9.2 Analytische Statistik

Überlebenszeitbasierte Berechnungen

Als Überlebenszeitparameter wurde das vorfallfreie Überleben (event free survival, EFS) verwendet. Für die Berechnung der vorfallfreien Überlebenszeiten wurde als Startpunkt die erste gesicherte komplette Remission gewählt. Endpunkt war das Auftreten eines morphologisch gesicherten Rezidivs oder eines gesicherten MDS nach stattgehabter kompletter Remission. Bei stabilen Remissionen war der Endpunkt der Beobachtung der 31.12.2004.

Für alle Patienten, bei denen mit der Standardinduktionstherapie keine komplette Remission zu induzieren war, wurde angelehnt an Haferlach et al.⁵⁴ als vorfallsfreie Überlebenszeit ein Monat gewählt. Dies entspricht der Zeit, die vom Einschluß in die Studie bis zur Feststellung der persistierenden Leukämie berechnet wird⁵⁵.

Alle Patienten, die primär allogenen transplantiert wurden, wurden für diese Untersuchungen ausgeschlossen.

Für die Analyse des vorfallfreien Überlebens und der Einflussfaktoren wurden zwei Testsysteme verwendet:

1. Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier⁵⁶
2. Cox-Regression⁵⁷ mit rückwärtsgerichteter Selektion

Die bekannten Einflussfaktoren auf das EFS (Alter, zytogenetisches Risiko und LDH-Werte bei Erstdiagnose) wurden einzeln auf eine Abhängigkeit vom neuen putativen Einflussfaktor GIN mittels Exaktem Test nach Fisher untersucht.

2.9.2.1. Exakter Test nach Fisher

Zur Untersuchung von Abhängigkeit oder Unabhängigkeit der verschiedenen bekannten Einflussfaktoren vom neuen putativen Risikofaktor GIN wurde der exakte zweiseitige Fishertest mittels Kontingenztabellen durchgeführt. Er ermöglicht die Abschätzung, ob zwei Variablen voneinander abhängig sind oder nicht. Die Vermutung der Unabhängigkeit wird hierbei als Nullhypothese gesetzt. Es wird ein p-Wert berechnet. Bei p-Werten

kleiner 0,05 wurde die Nullhypothese verworfen, d.h. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind die beiden Variablen voneinander abhängig⁵⁸.

Der Fisher-Test wurde durchgeführt mit den Variablenkombinationen

1. GIN/Alter
2. GIN/LDH-Level
3. GIN/zytogenetisches Risiko

2.9.2.2 Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier

Die Kaplan-Meier-Analyse erlaubt eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit mit der ein Ereignis nach einer bestimmten Zeit eintritt. Sie erlaubt auch ein leichtes Ablesen von Überlebenszeiten und -raten aus dem Diagramm. Mit der Kaplan-Meier-Analyse steht ein Verfahren zur Verfügung, mit dem Überlebenszeitanalysen unabhängig von der Beobachtungsdauer möglich sind. Der Beobachtungsbeginn war in dieser Studie jeweils die festgestellte CR, der Beobachtungsendpunkt entweder ein „Event“ oder ein fester Zeitpunkt (nämlich Beobachtungsende). Somit unterscheiden sich die Beobachtungszeiträume für jeden Patienten.

Zum Vergleich von zwei bzw. drei Patientengruppen wurde der Log Rank Test oder auch Mantel Cox Test verwendet. Mit diesem Test ist es möglich, den Unterschied zwischen zwei beobachteten Gruppen auf Signifikanz zu prüfen.

Der Vergleich bezüglich EFS erstreckte sich auf folgende Patientengruppen:

- Altersgruppe ≤ 50 Jahre / > 50 Jahre
- zytogenetisches Risiko „KaryoGruppe“ $\leq 2/3$
- $\text{LDH} \leq 700 \text{ U/l} / > 700 \text{ U/l}$
- GIN/kein GIN

Patienten mit dem zytogenetischen Risiko 1 und 2 wurden zu einer Gruppe zusammengefasst, da die Gruppe mit zytogenetischem Risiko 1 mit nur 4 Patienten zu

klein für eine gesonderte statistische Analyse war. Die Analyse von Alter, Karyogruppe und LDH diente dem Nachweis der Repräsentativität der Stichprobe, da sich bei größeren AML-Patientenkollektiven⁵⁴ bei diesen Parametern ein signifikanter Unterschied ergibt.

2.9.2.3 Cox-Regressionsanalyse

Das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer Einflussgrößen auf ein bestimmtes Ereignis verlangte die individuelle Gewichtung der Einflussgrößen in einem Modell. Dazu bot sich die multivariate Regressionsanalyse nach Cox²⁸ an. Als Einflussgrößen flossen in die Berechnung des Modells folgende Größen als kategoriale Daten (nur 0 oder 1) ein:

- Altersgruppe ≤ 50 Jahre / > 50 Jahre
- zytogenetisches Risiko „KaryoGruppe“ $\leq 2/3$
- LDH $\leq 700 \text{ U/l}$ / $> 700 \text{ U/l}$
- GIN/kein GIN

Als Methode wurde das vorwärtsgerichtete bedingte Einschlussverfahren gewählt. Die Wahrscheinlichkeit für die Aufnahme in das gefundene Modell wurde mit 0,05 gewählt. Variablen werden dann in das Modell aufgenommen, wenn sich die Qualität des Modells verbessert. Die zeigt sich durch

- sinkenden p-Wert für das Gesamtmodell
- sinkendes -2LogLikelihood
- steigendes Chi-Quadrat.

Ist in dem gefundenen Modell „GIN“ mit einem p-Wert $< 0,05$ enthalten, kann man auftretende genetische Instabilität in den Stammzellen der Remissionshämatopoese als neuen Risikofaktor werten.

3. Ergebnisse

3.1 AML-Patienten

3.1.1 Patientencharakteristik

Alter

Die Aufteilung in Altersgruppen unter 20 Jahren, 21 bis 30 Jahre, 31 bis 40 Jahre, 41 bis 50 Jahre, 51 bis 60 Jahre und 61 bis 70 Jahre erbrachte die in der Tabelle wiedergegebene Verteilung. 40 Patienten (65,6%) waren 50 Jahre und jünger, 21 (34,4%) waren über 50 Jahre alt.

Das Durchschnittsalter lag bei 44,82 Jahren, der Median bei 45 Jahren. Das Alter bei der Erstdiagnose bewegte sich zwischen 17 und 63 Jahren. Der Vergleich mit größeren Patientenkollektiven⁵⁴ zeigt eine ähnliche Altersverteilung. Es ist lediglich ein Fehlen der über 63-jährigen anzumerken. Dies erklärt sich mit der fehlenden Empfehlung für autologe PBSZT für Patienten älter als 65 Jahre.

Altersgruppe	Anzahl	Prozent	Alter bei ED	
0-20	3	4,92	Durchschnitt	44,82
21-30	3	4,92	Median	45
31-40	15	24,59	Bereich	17-63
41-50	19	31,15		
51-60	16	26,23		
61-70	5	8,20		

Tabelle 12: Zugehörigkeit zu Altersgruppen, arithmetisches Mittel, Median und Altersbereich; n=61

Alter bei ED	
Median	53
Bereich	16-82

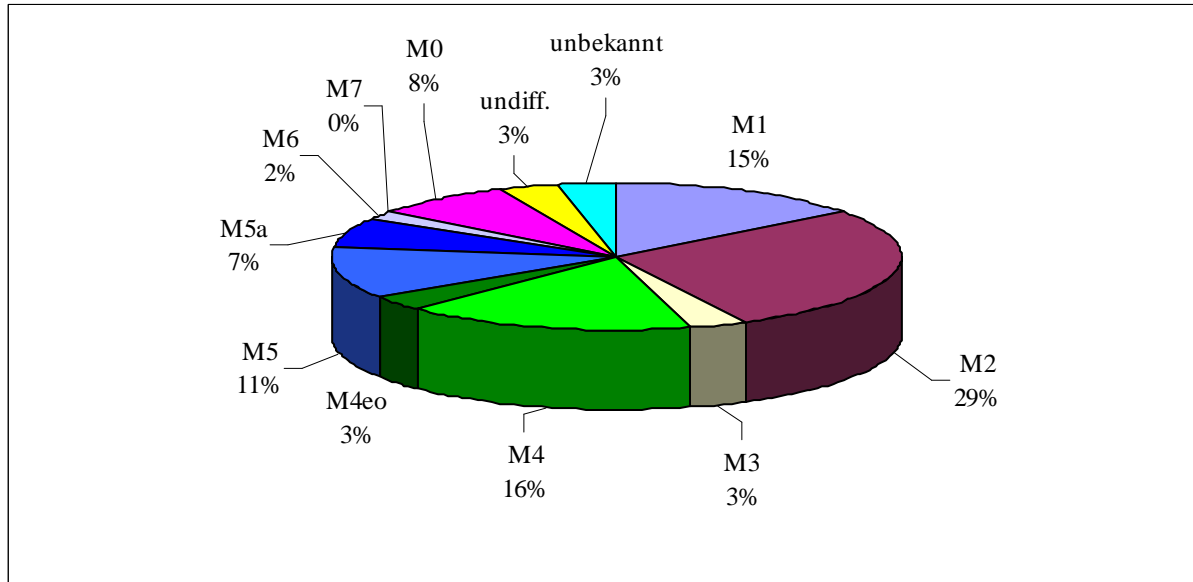
Tabelle 13: Altersmedian und -bereich in der Vergleichsgruppe (Haferlach)

Zuordnung zu FAB-Subklassifikationen

Dem morphologischen Subtyp M1 konnten 9 (14,8%), dem Subtyp M2 17 (27,9%) und dem Subtyp M3 2 Knochenmarksausstriche bei Erstdiagnose AML zugeordnet werden. Der Subtyp M4 war 12 mal (19,7%) vertreten wobei in 2 Fällen (3,3%) eosinophile Granulozyten festgestellt wurden (M4eo). Insgesamt 11 Fälle des Subtyps M5 wurden diagnostiziert, wobei bei 4 dieser Patienten überwiegend monozytäre Zellen gesehen wurden (M5a). FAB M6 war in der Gruppe einmal, M7 nicht und M0 fünf mal vertreten. zwei mal lautete die Diagnose M0. In der Gruppe fanden sich zwei Patienten mit undifferenzierter, nicht näher klassifizierter Leukämie. Bei zwei Patienten war das Datenmaterial der FAB-Klassifikation nicht eruierbar.

AML-Subtypen	Anzahl n=61	%	Haferlach ⁵⁴ %
M1	9	14,8	19,1
M2	17	27,9	32,2
M3	2	3,3	6,7
M4	10	16,4	16,9
M4eo	2	3,3	6,2
M5	7	11,5	6,2
M5a	4	6,6	5,9
M6	1	1,6	3,3
M7	0	0,0	0,3
M0	5	8,2	3,3
undiff.	2	3,3	*
unbekannt	2	3,3	*

Tabelle 14: Verteilung der FAB-Subklassifikationen



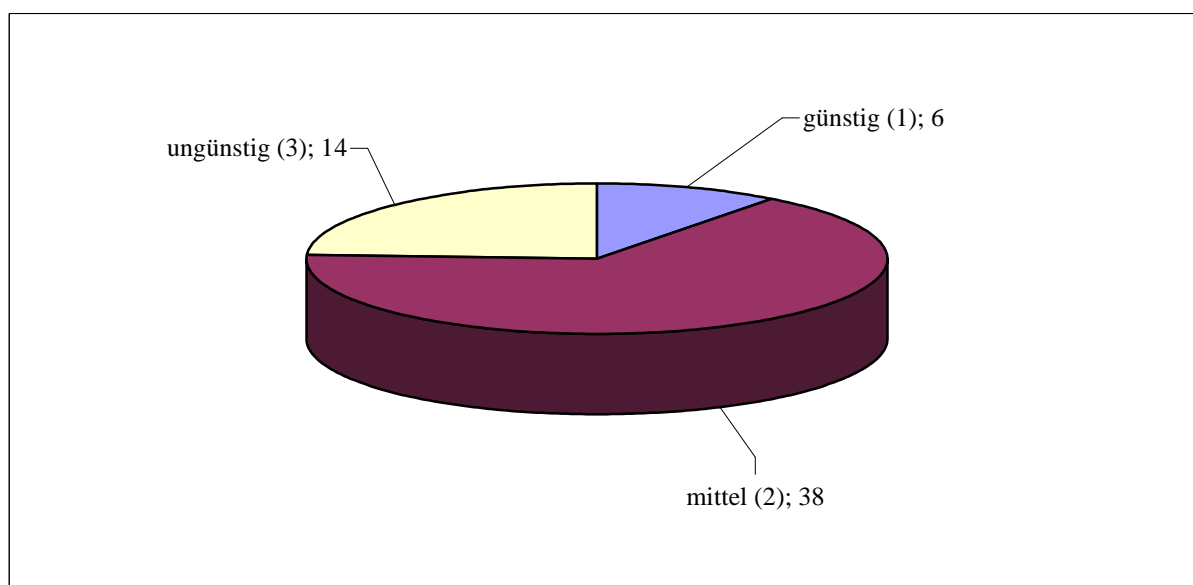
Grafik 1: Verteilung der FAB-Subklassifikationen

Zytogenetik

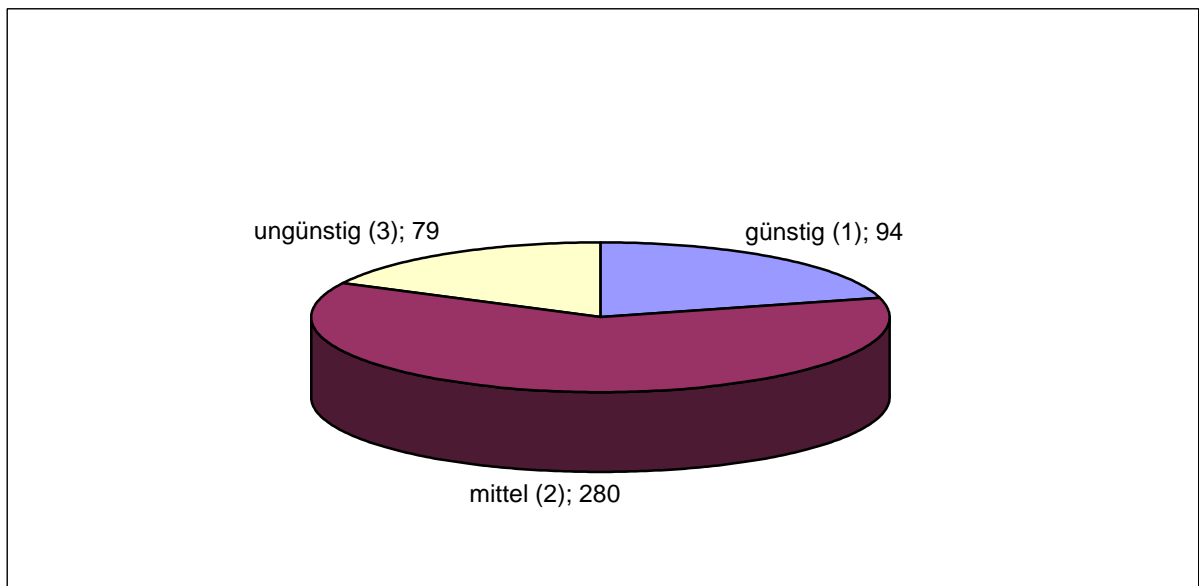
Auch das zytogenetische Risiko entsprach mit 6 (9,84%) Patienten mit günstigem, 38 (62,30%) mit mittlerem und 14 (22,95%) mit ungünstigem Risiko dem von größeren Patientenkollektiven⁵⁴. Bei drei Patienten lagen die zytogenetischen Untersuchungsergebnisse nicht vor.

Risikogruppen	Anzahl n=61	%	Haferlach ⁵⁴
günstig 1	6	10,34	20,7
mittel 2	38	65,51	61,8
ungünstig 3	14	24,14	17,5
unbekannt	3	*	*

Tabelle 15: Verteilung des zytogenetischen Risikos



Grafik 2: Verteilung des zytogenetischen Risikos, Patientenkollektiv dieser Studie; n=61



Grafik 3: Verteilung des zytogenetischen Risikos; Haferlach-Gruppe

Blastenanteil bei der Erstdiagnose

Entsprechend der WHO-Klassifikation⁵⁹ lag der Blastenanteil im Knochenmarksausstrich durchgehend bei über 20%. Lediglich bei einem Patienten lag ein medullärer Blastenanteil von 10-15% vor. Bei Vorliegen der Translokation t(8,21) wurde nach klinischen Gesichtspunkten trotzdem die Diagnose AML gestellt. Es liegt Datenmaterial für 53 (86,9%) der 61 Patienten bezüglich des medullären Blastenanteils bei der mikroskopischen Untersuchung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vor. Bei 12 (22,6%) Patienten lag der Blastenanteil unter 75%, bei den restlichen 41 Patienten (77,6%) lag der Blastenanteil bei oder über 75%.

Bei Haferlach et al.⁵⁴ fanden sich bei 41,8% der Patienten Werte unter 75% Blastenanteil, bei 58,3% über 75%.

Serum-LDH zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

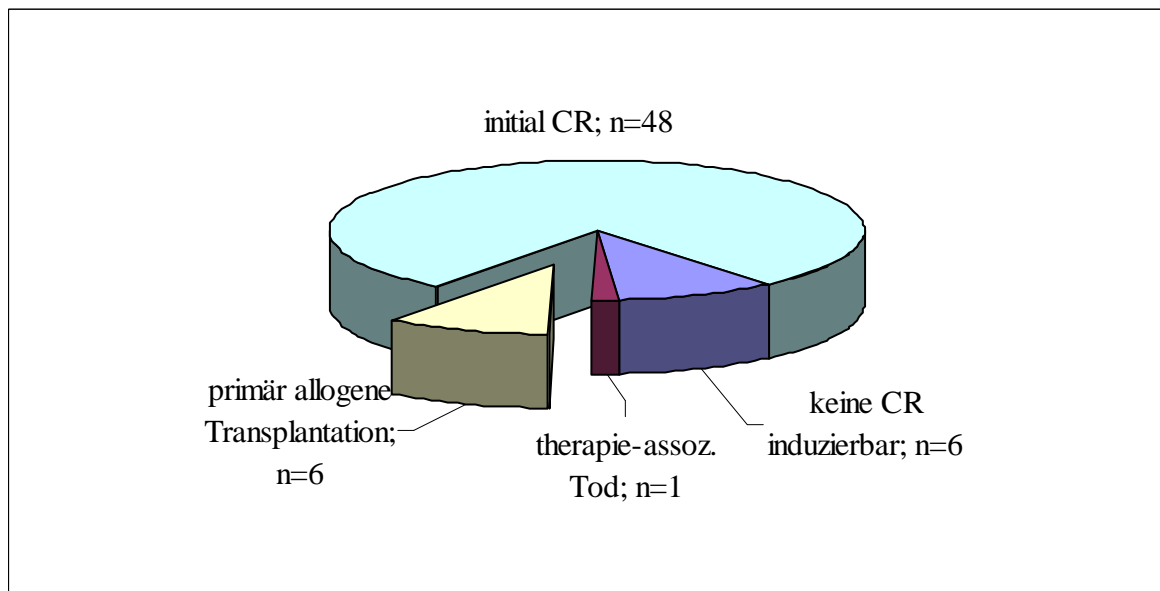
In 58 (95%) der Fälle liegen Daten über den Serum-LDH-Spiegel zum Erstdiagnosezeitpunkt vor. Dabei war bei 42 Patienten (72,4%) der LDH-Wert weniger oder gleich 700 U/l. Bei 16 (27,6%) Patienten überstieg er diesen Referenzwert.

Bei Haferlach et al.⁵⁴ fanden sich 72% Patienten mit LDH-Spiegeln unter 700 U/l und 28% über diesem Grenzwert.

Therapieerfolg der Induktion bzw. Doppelinduktion

Bei sechs der 61 Patienten fiel die Therapieentscheidung zugunsten der primären allogenen Transplantation. Der Therapieerfolg wurde hierbei nicht gesondert verfolgt. Bei den anderen 55 Patienten konnte nach den ersten Therapiezyklen (TAD-HAM Doppelinduktion) 48 (87,3%) komplette Remissionen (complete remission, CR) verzeichnet werden. Bei sechs (10,9%) Patienten konnte keine komplette Remission induziert werden. Ein Patient (1,8%) verstarb während der ersten Therapiezyklen.

(Grafik 4)

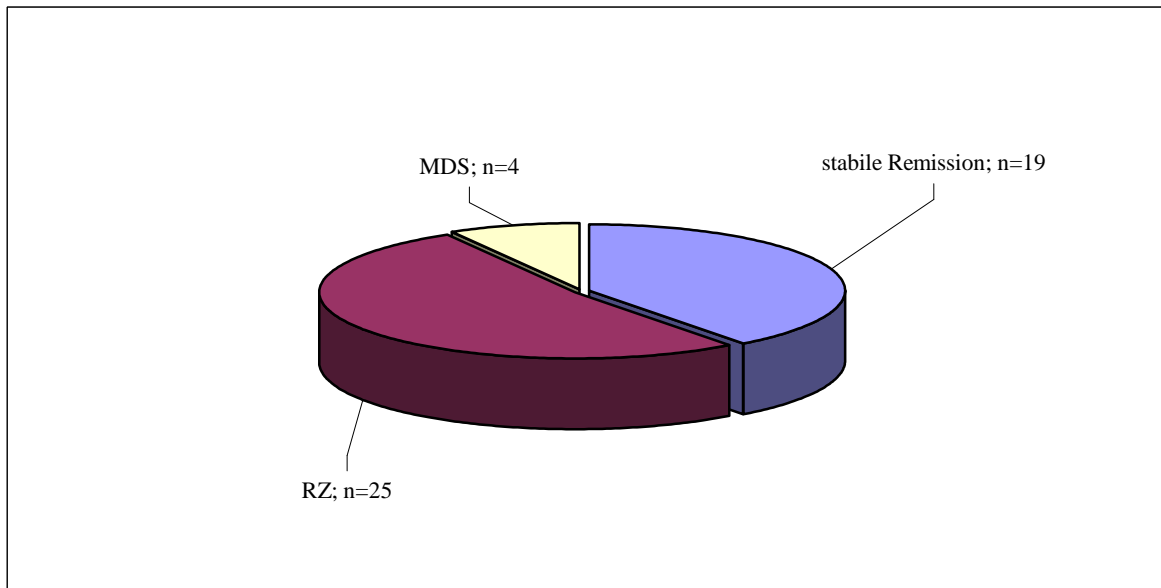


**Grafik 4: Remissionsstatus nach TAD-HAM;
n=61**

Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigten sich bei den 48 initialen Remissionen nur in 19 Fällen stabile Remissionen, in 25 Fällen ein Rezidiv und bei 4 Patienten ein MDS.

(Grafik 5)

Auch diese Verteilung ist ähnlich der in größeren Gruppen.⁵⁴ Dort zeigte sich in 69% der Fälle eine induzierbare erste Remission, in 9,2% keine Remission und früher Tod in 21,8% der Fälle.



Grafik 5: zeitliches Verhalten der initialen Remissionen; n=48

3.1.2 Detektion von Minimaler Resterkrankung

Nach der in 2.1.1 beschriebenen Methode konnte in keinem der Leukaphereseprodukten der AML-Patienten Minimale Resterkrankung (MRD) nachgewiesen werden.

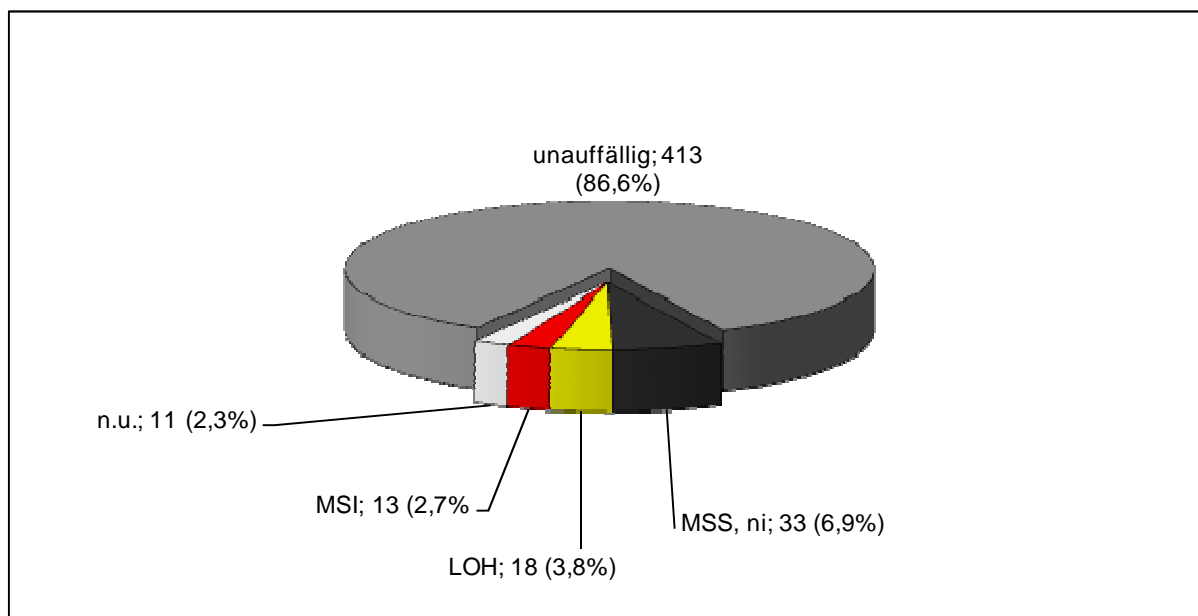
3.1.3 Vorkommen und Häufigkeit von LOH, MSI und GIN in CD34 positiver Fraktion

Patientenübergreifende Analyse aller untersuchten Genorte

Es wurden insgesamt 488 PCR-Untersuchungen durchgeführt. (61 Patienten, je acht Primer). In 11 Fällen erbrachten die Untersuchungen keine verwertbaren Ergebnisse. Die restlichen 477 Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse: In 413 (86,6%) Fällen zeigte sich Mikrosatellitenstabilität (MSS) und kein LOH bei für LOH aussagekräftiger Beschaffenheit der Allele (vgl. 2.8.4 und 2.8.5). In 33 (6,9%) Fällen zeigte sich MSS, ohne über LOH eine Aussage machen zu können, da die untersuchten Genorte bzgl. LOH nicht informativ (ni) waren (vgl. 2.8.4 und 2.8.5).

Ergebnisse

Auffällig waren 31 Genorte (6,5%). Von diesen 31 Genorten zeigten 18 (3,8%) Genorte die Kriterien für LOH, 13 (2,7%) die für MSI.



Grafik 6: Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse, bezogen auf alle untersuchten Genorte

Patientenübergreifende Analyse der einzelnen Genorte

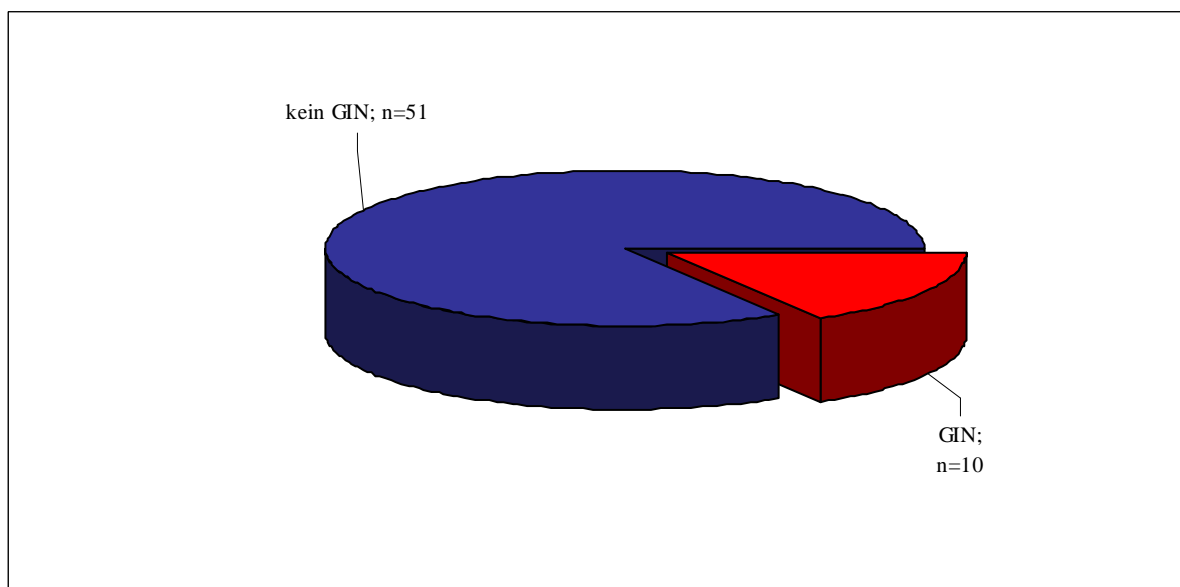
Bezogen auf die einzelnen Primer ergab sich eine relativ homogene Verteilung der Auffälligkeiten. In allen verwendeten Primern konnten im Patientenkollektiv genetische Veränderungen nachgewiesen werden. Am häufigsten betroffen war der p53-Genort mit insgesamt 6 Auffälligkeiten (4mal LOH, 2mal MSI), am wenigsten betroffen waren die Genorte hMSH2 und BRCA1 vertreten durch die Primer D2S123 und MFD15 mit je zwei Auffälligkeiten. hMSH2 zeigte zwei LOHs, BRCA1 ein LOH und ein MSI (siehe Tabelle 16).

Primer	D7S468	D7S525	D8S559	TP53ALS	D11S1356	D2S123	APC	MFD15
unauffällig	51	50	49	49	53	52	52	57
ni	4	7	6	4	2	7	2	1
LOH	3	2	3	4	2	0	3	1
MSI	1	1	1	2	1	2	4	1
kein Ergebnis	2	1	2	2	3	0	0	1

Tabelle 16: Ergebnisse der genetischen Untersuchung; übergreifend alle Genorte

Patientenbezogene Analyse / GIN

Insgesamt 12 (19,7%) Patientenproben mit aufgereinigten CD34+ hämatopoetischen Stammzellen wiesen in einem oder mehreren Primern eine Auffälligkeit auf. GIN nach der Definition in 2.8.6 ([1] zwei LOH, oder mehr; [2] MSI oder [3] D8S559 betroffen) war bei 10 Patienten (16,4%) zu diagnostizieren.



Grafik 7: Patienten mit GIN

3.1.4 LOH, MSI und GIN in Knochenmarksausstrichen während der Remission

In den untersuchten Knochenmarksausstrichen (n=47) wurden keine Auffälligkeiten an den untersuchten Genorten bezüglich LOH und MSI gefunden, obwohl sieben der 47 untersuchten Proben in der korrespondierenden CD34 pos. Zellfraktion GIN nach 2.8.6 aufwiesen.

3.1.5 Analytische Statistik

3.1.5.1 Abhängigkeit von GIN in CD34pos.-Stammzellen der Remissionshämatopoese von Alter, LDH und zytogenetischem Risiko

Die Abhängigkeit der bekannten Risikofaktoren Alter, LDH und erhöhtes zytogenetisches Risiko wurden mittels exakten Tests nach Fisher ermittelt. Grundlage waren alle verfügbaren Befunde des Patientenkollektives der 61 untersuchten AML-Patienten.

Der exakte Fisher-Test liefert einen p-Wert. Ist dieser p-Wert kleiner als α (0,05) gelten die Variablen als voneinander abhängig. Ist p größer als α gelten die Variablen als voneinander unabhängig.

- **Test auf Abhängigkeit von Altersgruppen und GIN**

Es wurden zwei Altersgruppen gebildet (≤ 50 Jahre/ > 50 Jahre). Sechs der unter 50jährigen (n=40) und vier der über 50jährigen (n=21) wiesen GIN in den Stammzellen der Remissionshämatopoese auf. Der Fisher-Test lieferte einen p-Wert von 0,725. GIN und Altersgruppe gelten somit als voneinander unabhängig.

		GIN	
		0	1
Alter (Jahre)	≤ 50	34	6
	> 50	17	4

Exakter Fisher-Test:	
p-Wert	0,725
(Zweiseitig)	
alpha	0,05

Tabelle 17: Kontingenztabelle Altersgruppe/GIN; n=61

- **Test auf Abhängigkeit von niedrigen/hohen LDH-Werten und GIN**

Es wurden zwei Gruppen nach LDH-Wert bei der Erstdiagnose AML gebildet ($\leq 700 \text{ U/l}$ / $> 700 \text{ U/l}$). LDH-Werte bei ED waren nur bei $n=58$ Patienten dokumentiert. Sechs der Patienten mit kleineren LDH-Werten ($n=42$) und vier der Patienten mit hohen LDH-Werten ($n=16$) wiesen GIN in den Stammzellen der Remissionshämatopoese auf. Der Fisher-Test lieferte einen p-Wert von 0,439. GIN und LDH-Wert gelten somit als voneinander unabhängig.

		GIN	
		0	1
LDH (U/l)	≤ 700	36	6
	> 700	12	4

Exakter Fisher-Test:

p-Wert (Zweiseitig) 0,439

alpha 0,05

Tabelle 18: Kontingenztafel LDH $>$ od. $\leq 700 \text{ U/l}$ /GIN (1)-kein GIN (0); $n=58$

- **Test auf Abhängigkeit vom Karyoriskgruppen und GIN**

Von $n=58$ Patienten war das zytogenetische Risiko bekannt. Um dichotome Merkmale zu erhalten wurden die drei Risikogruppen zu zwei Gruppen zusammengefasst. Eine Gruppe beinhaltet die Karyoriskgruppe 1 und 2 ($n=44$), die andere die Karyoriskgruppe 3 ($n=14$). In der niedrigen Karyorisk-Gruppe war GIN sechsmal zu detektieren, in der Gruppe mit hohem zytogenetischem Risiko viermal. Der Fisher-Test zeigte einen p-Wert von 0,233. Somit gelten die Zugehörigkeit zur Karyorisk-Gruppe und das Auftreten von GIN als voneinander unabhängig.

		GIN	
		0	1
Karyorisk	≤ 2	38	6
	3	10	4

Exakter Fisher-Test:

p-Wert (Zweiseitig) 0,233

alpha 0,05

Tabelle 19: Kontingenztafel Karyoriskgruppen ≤ 2 u. 3 / GIN (1)-kein GIN (0); $n=58$

3.1.5.2 Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier

Das EFS (event-free survival, siehe 2.9.2) der AML-Patienten in Abhängigkeit von Alter, LDH, Karyorisk und GIN wurde untersucht. Zur Analyse konnten nur Patientendaten herangezogen werden, bei denen der jeweilig komplette Datensatz vorhanden war. Patienten, die aufgrund von primär allogener Transplantation oder therapieassoziiertem Tod einer überlebenszeitbasierten Untersuchung nicht zugänglich sind, wurden für diese Analyse ausgeschlossen. Die mediane Beobachtungszeit war 19,5 Monate, die durchschnittliche Beobachtungszeit 36,5 Monate. Es finden sich Beobachtungszeiten von 1 Monat bis 139,9 Monaten.

Alter

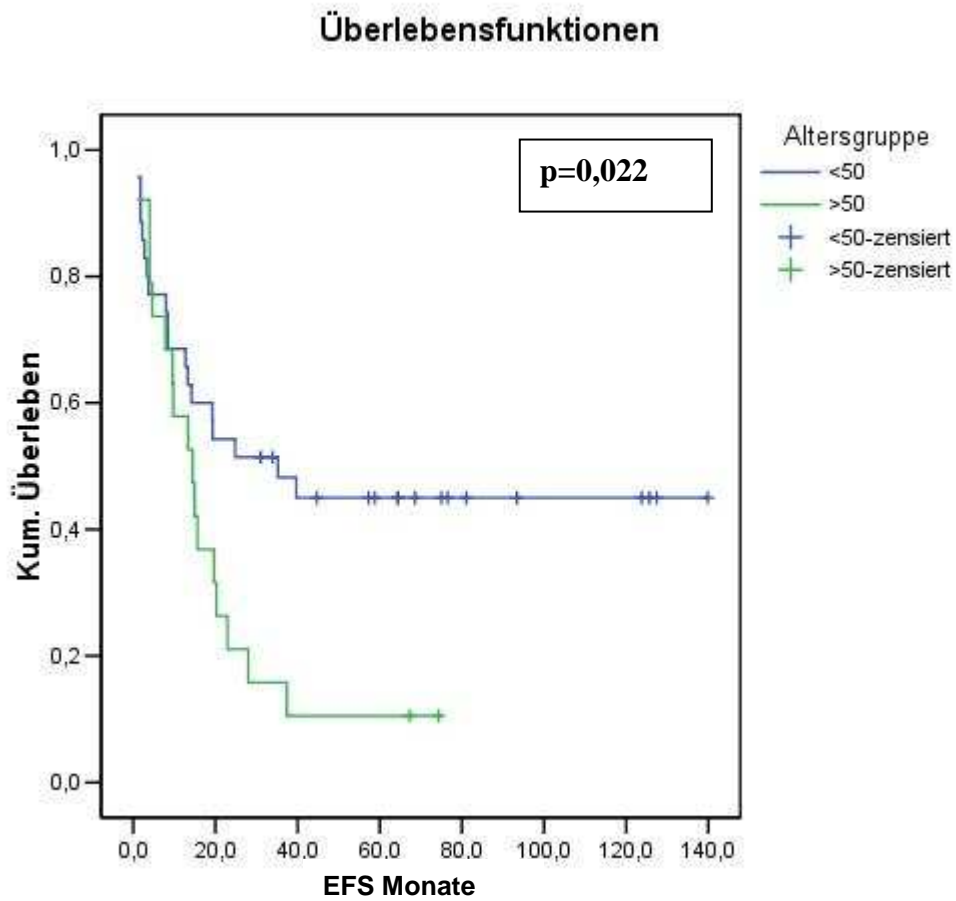
Es wurden zwei Altersgruppen gebildet (≤ 50 Jahre/ > 50 Jahre). Die unter 50jährigen (n=35) wiesen ein 3,5 fach längeres Überleben auf als die über 50jährigen (n=19) (69,5 versus 19,7 Monate)

Bezüglich des medianen Überlebens überschneiden sich die Konfidenzintervalle, so dass kein signifikanter Unterschied abzuleiten ist.

n=61	durchschnittliches EFS (Monate)*	medianes EFS (Monate)
≤ 50 Jahre, n=35	69,5 (KI95: 48,0 - 91,0)	35,2 (KI95: 7,1 - 63,3)
> 50 Jahre, n=19	19,7 (KI95: 10,3 - 29,1)	14,4 (KI95: 7,0 - 21,0)

* $p < 0,05$; n=54

Der Log-Rank Test auf Unterschied zwischen den Kaplan-Meier Überlebensfunktionen von beiden untersuchten Gruppen ergab einen signifikanten p-Wert von 0,022.



Grafik 8: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier; Altergruppen ≤50 Jahre (n=35)/> 50 Jahre (n=19), gesamt n=54

Karyogruppe

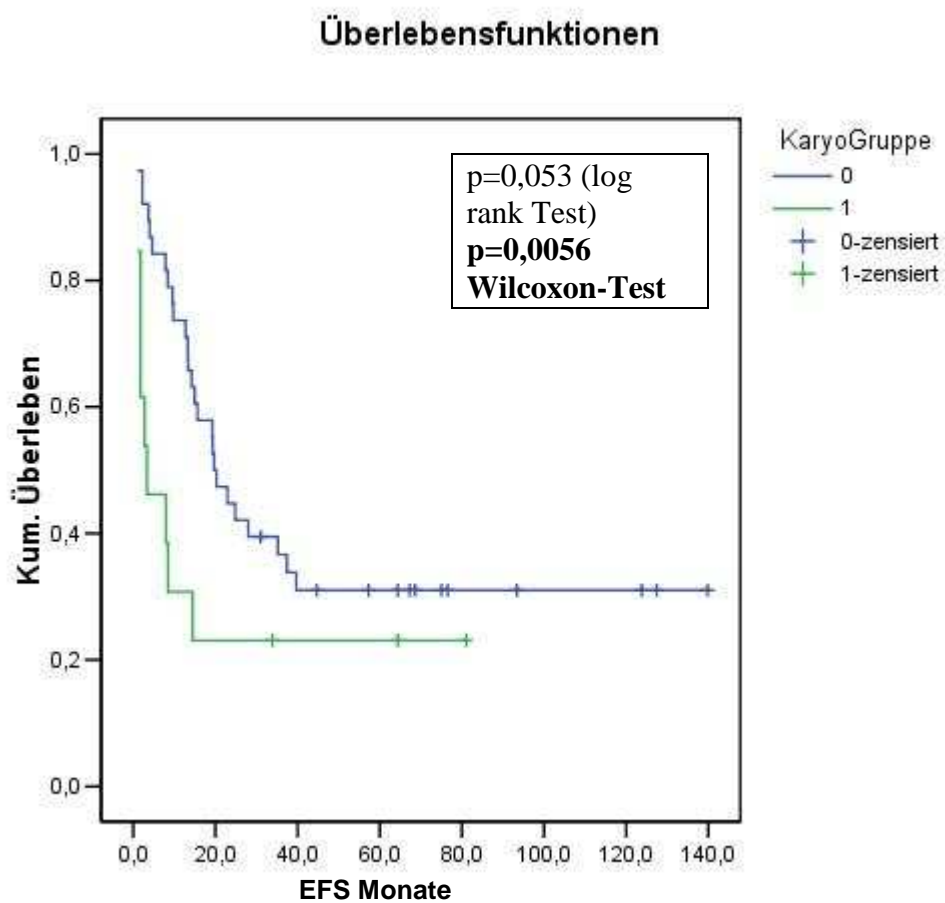
Die Gruppe mit dem zytogenetischen Risiko 1 und 2 bestand aus n=38 Patienten, die Gruppe mit dem Risiko 3 aus n=13 Patienten.

Der Vergleich der Karyogruppen mit dem zytogenetischen Risiko ≤ 2 bzw. 3 ergab eine statistische Signifikanz für die mediane EFS. Für das mittlere EFS konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden.

n=58	durchschnittliches EFS (Monate)	medianes EFS (Monate) *
≤ 2, n=38	54,2 (KI95: 36,6 - 72,8)	19,7 (KI95: 7,1 - 63,3)
3, n=13	22,2 (KI95: 4,3 - 39,7)	3,4 (KI95: 0,0 - 10,7)

* $p < 0,05$; n=51

Der Unterschied der Kaplan-Meier Überlebensfunktionen erreichte mit der hier verwendeten Teststatistik (log rank-Test) das geforderte Signifikanzniveau nur knapp nicht ($p=0,053$). Mit dem in der Literatur ebenfalls weit verbreiteten generalisierten Wilcoxon-Test, der eher die frühen Kurvenabschnitte bewertet, konnte jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0056$) gemessen werden.



Grafik 9: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier; zytogenetisches Risiko 1 und 2 = KaryoGruppe 0 (n=38), zytogenetisches Risiko 3 = KaryoGruppe 1 (n=13); geamt n=51

LDH

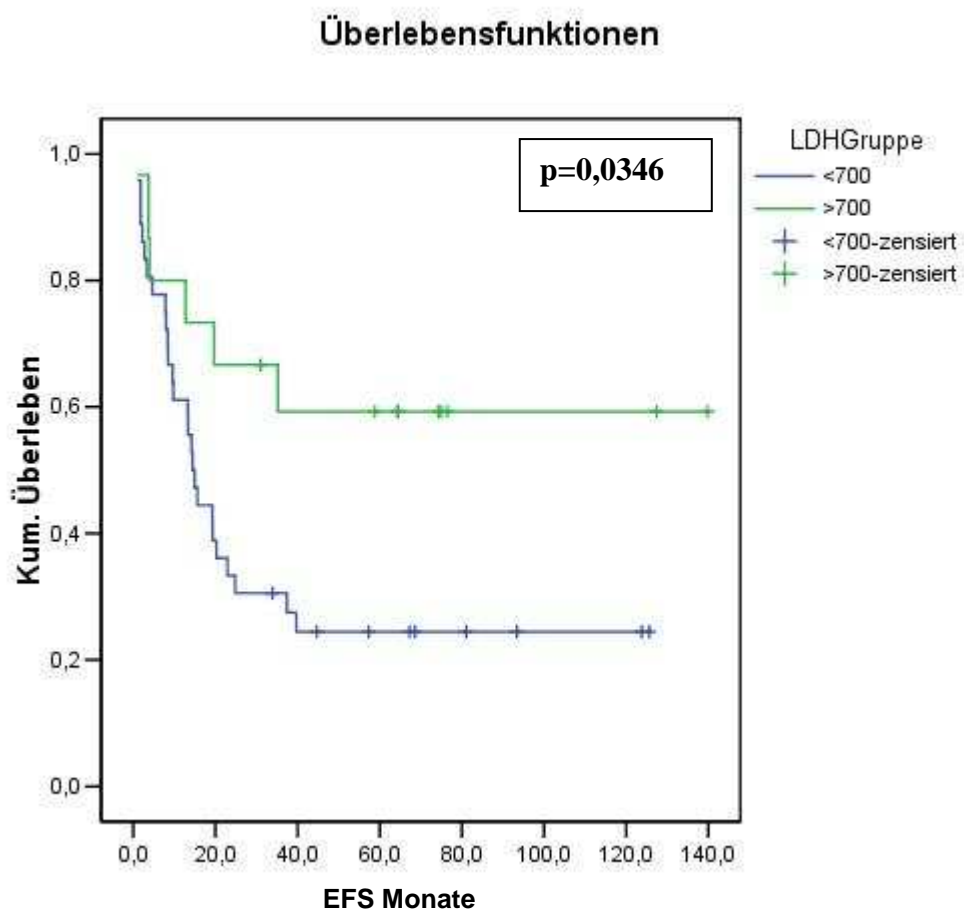
Es wurden zwei Gruppen nach LDH-Wert bei der Erstdiagnose AML gebildet ($\leq 700 \text{ U/l}$ / $> 700 \text{ U/l}$). Die Gruppe der Patienten mit kleineren LDH-Werten bestand aus $n=36$ Individuen, hohe LDH-Werte fanden sich bei $n=15$ Patienten.

Beim Vergleich der mittleren und medianen EFS-Zeiten ergab sich eine statistische Signifikanz für den Unterschied des medianen Überlebens. Bemerkenswert ist, dass in der untersuchten Gruppe eine LDH über 700 U/l damit einen Überlebensvorteil bietet. Für den Unterschied der mittleren EFS wurde Signifikanz knapp verfehlt.

n=58	durchschnittliches EFS (Monate)	medianes EFS (Monate)*
$\leq 700 \text{ U/l}$, n=36	40,4 (KI95: 24,1 - 56,6)	14,4 (KI95: 11,1 - 17,8)
$> 700 \text{ U/l}$, n=15	88,2 (KI95: 56,2 - 120,3)	61,6 (KI95: 39,4 - 83,8)

* $p < 0,05$; $n=51$

Der Unterschied der Überlebensfunktionen der Kaplan-Meier Analytik erreichte statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0346.



Grafik 10: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier; LDH-Gruppen ≤ 700 U/l (n=36) und >700 U/l (n=15), gesamt n=51

GIN

Der neue putative Risikofaktor GIN wurde den gleichen Prozeduren unterworfen, wie die obenstehenden bekannten Risikofaktoren Alter, zytogenetisches Risiko und LDH.

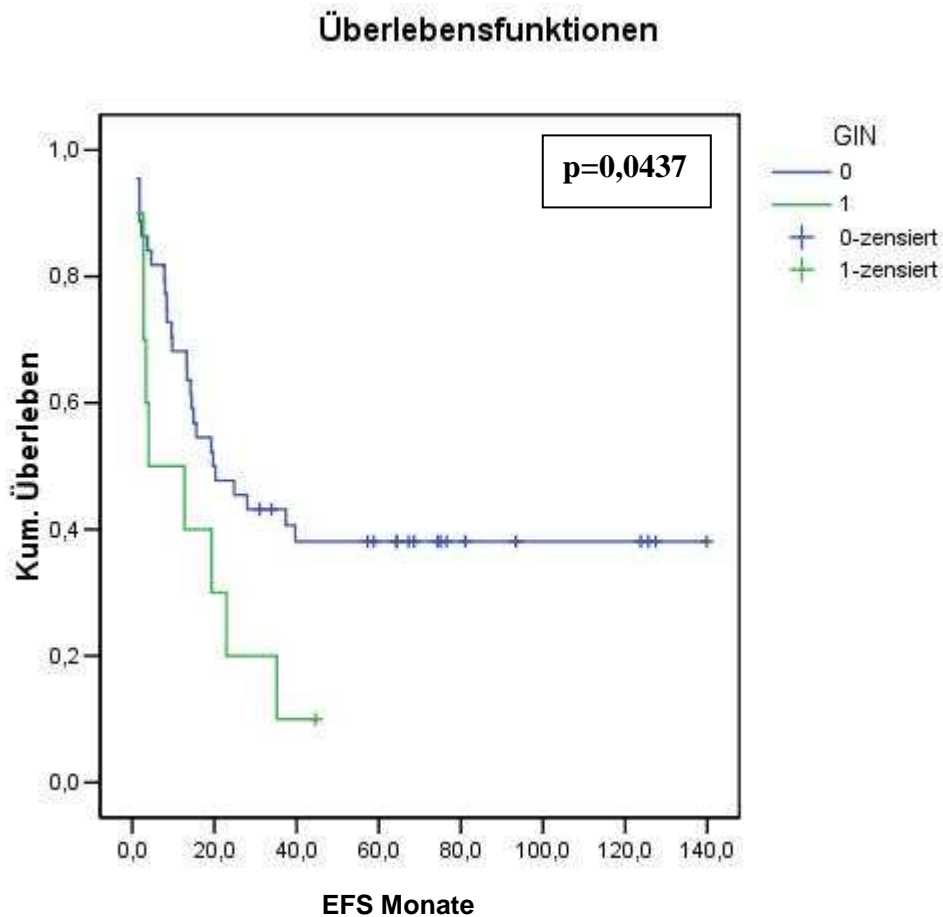
Die Patienten ohne GIN in den Stammzellen der Remissionshämatopoese (n=44) wiesen ein 4,2faches durchschnittliches EFS verglichen mit den GIN positiven Patienten (n=10) auf.

Bei der Untersuchung des medianen und mittleren EFS ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei der durchschnittlichen Überlebenszeit. Beim medianen EFS konnte ein signifikanter Unterschied nicht dargestellt werden.

n=61	durchschnittliches EFS (Monate)*	medianes EFS (Monate)
GIN=0, n=44	61,3 (KI95: 42,8 - 79,8)	19,7 (KI95: 5,5 - 33,9)
GIN=1, n=10	14,7 (KI95: 5,6 - 23,8)	4,0 (KI95: 0,0 - 18,5)

* $p < 0,05$; n=54

Auch beim statistischen Vergleich der Überlebensfunktionen für GIN0/GIN1 konnte ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p=0,0437$):



Grafik 11: Überlebensfunktionen nach Kaplan-Meier; GIN0 n=44/GIN1 n=10, gesamt n=54

3.1.5.3 Cox-Regressionsanalyse

Für die Cox-Regressionsanalyse sind komplette Datensätze der Patienten bezüglich der zu untersuchenden Variablen notwendig. Untersucht wurden die dichotomen Gruppen Alter, KaryoGruppe, LDH und GIN wie oben beschrieben. Patienten mit einer primär allogenen Transplantation wurden ausgeschlossen. Die Gesamtzahl der untersuchten Patienten für diese Analyse reduzierte sich somit auf n=48

Gesamtmodell

Als erste Variable wurde das Alter in Form der Zugehörigkeit zu den festgelegten Altersgruppen in das Modell aufgenommen. Dabei ergab sich ein -2Log-Likelihood

(-2LL) von 219,964, das Chi-Quadrat betrug 5,593 bei einer Gesamtsignifikanz von 0,018. Als nächstes wurde das zytogenetische Risiko wiederum als kategoriale Variable (siehe 2.9.2.3) in das Modell aufgenommen. -2Log-Likelihood sank daraufhin auf 215,703, Chi-Quadrat stieg auf 10,147 bei einer Gesamt-Signifikanz von 0,006.

Die neu zu prüfende Variable GIN wurde mit einer Verbesserung des-2LL auf 211,599, des Chi-Quadrat auf 14,833 und der Signifikanz auf 0,002 in das Modell aufgenommen.

Die Zugehörigkeit zur LDH-Gruppe wurde aus Signifikanzgründen nicht in das Modell mit aufgenommen.

Schritt	-2 Log-Likelihood	Gesamt (Wert)		
		Chi-Quadrat	df	Signifikanz
1 ^a	219,964	5,593	1	0,018
2 ^b	215,703	10,147	2	0,006
3 ^c	211,599	14,833	3	0,002

a. Variable(n) eingegeben in Schritt Nr. 1: Altersgruppe

b. Variable(n) eingegeben in Schritt Nr. 2: KaryoGruppe

c. Variable(n) eingegeben in Schritt Nr. 3: GIN

Tabelle 20: Cox-Regression, Parameter des Gesamtmodells bei schrittweiser Einschlussmethode, n=48

Einzelvariablen

Nach dem dritten Schritt des Einschlusses ergab sich für die Einzelvariablen folgende Charakteristika: Altersgruppe erzielte in Bezug auf EFS ein relatives Risiko (hier Exp(B)) von 2,674, d.h. ein Patient in der höheren Altersgruppe hat nach diesem Modell bei einem p-Wert von 0,007 mit einem 2,674 fachen Risiko ein Event (siehe 2.9.2) zu erleiden. Karyogruppe erzielte ein relatives Risiko von 2,683 bei p=0,017.

Auch GIN zieht nach diesem Modell ein 2,397 faches Risiko nach sich, ein Event zu erleiden. Das geforderte statistische Niveau wurde auch für GIN erfüllt (p=0,031)

Ergebnisse

		B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)
Schritt 1	Altersgruppe	,826	,358	5,310	1	,021	2,283
Schritt 2	Altersgruppe	,966	,369	6,852	1	,009	2,627
	KaryoGruppe	,893	,405	4,861	1	,027	2,442
Schritt 3	Altersgruppe	,983	,368	7,154	1	,007	2,674
	KaryoGruppe	,987	,414	5,694	1	,017	2,683
	GIN	,874	,405	4,659	1	,031	2,397

Tabelle 21: Cox-Regression, Parameter der Einzelvariablen bei schrittweiser Einschlussmethode, n=48

3.2 Kontrollgruppe

3.2.1 Patientencharakteristik

Alter

Die Aufteilung der Altersgruppen erfolgte wie bei den AML-Patienten. Die Verteilung ist in Tabelle 22 wiedergegeben. Es waren 18 Patienten (64,3%) 50 Jahre und jünger. 10 (35,7%) Patienten waren über 50 Jahre alt. Das arithmetische Altersmittel bei Erstdiagnose lag bei 45,51 Jahren, der Median bei 47 Jahren.

Alter	Anzahl	Prozent	Alter bei ED	
bis 20	0	0	Mittel	45,51
21 bis 30	2	7,14	Median	47
31 bis 40	7	25,00	Bereich	20-63
41 bis 50	9	32,14		
51 bis 60	8	28,57		
über 60	1	3,57		

Tabelle 22: Zugehörigkeit zu Altersgruppen, arithmetisches Mittel, Median und Altersbereich

Im Vergleich zur AML-Gruppe in dieser Untersuchung zeigt sich sowohl eine sehr ähnliche Verteilung in den einzelnen Altersgruppen, als auch bei Median (AML: 45 J., Kontrolle: 47J.) und mittlerem Alter (AML: 44,82 J.; Kontrolle: 45,51J.)

3.2.2 Vergleich der Chemotherapien der untersuchen AML-Patienten und der Kontrollgruppe.

Alle 61 Patienten der AML-Gruppe erhielten bis zur Stammzellapherese dosisintensive Therapie simultan mit Anthrazyklinen (Daunorubicin bei TAD und Mitoxantron bei HAM) und Nukleosidanaloga (Thioguanin und Cytosinarabinosid [AraC]).

Die 27 der 28 Patienten der Kontrollgruppe erhielten eine dosisintensive Therapie mit Anthrazyklinen in Verbindung mit anderen Chemotherapeutika (Schemata siehe Tabelle 23) Ein Patient erhielt zusätzliche dosisintensive Therapie mit Nukleosidanaloga (1x AraC), ein Patient nur Nukleosidanaloga (Fludarabin) in Verbindung mit anderen Chemotherapeutika.

Doxorubicin alleine	11
Doxorubicin und Epirubicin	14
Doxorubicin, Epirubicin und Idarubicin	1
Epirubicin alleine	1
Epirubicin und Idarubicin	1
Nukleosidanalogen (AraC)	1
Doxorubicin, Epirubicin und Nukleosidanalogen (Fludarabin)	1

Tabelle 23: Anthrazykline und Nukleosidanaloga in der Kontrollgruppe

3.2.3 LOH, MSI und GIN in der CD34 positiven Fraktion der Kontrollgruppe

In den Leukaphereseprodukten der Patienten der Kontrollgruppe wurden keine Auffälligkeiten an den untersuchten Genorten bezüglich LOH und MSI gefunden.

4. Diskussion

Die Vorhersehbarkeit des Krankheitsverlaufs einer AML ist aus Mangel an belastbaren Prognosefaktoren sehr gering. Noch immer ist die Entscheidung zur zusätzlichen allogenen Transplantation zur Konsolidierung mit all ihren Chancen und Risiken schwierig. Neu definierte Risikofaktoren können ein Schritt zur Erleichterung dieser Entscheidung sein.

Qualitative und quantitative Veränderungen auf Stammzellniveau in der Remissionshämatopoese nach AML sind seit längerem bekannt. Martinez et al.⁶⁰ wiesen eine verändertes Verhältnis von CD34pos lymphatischen und myeloischen Progenitorzellen bei AML-Patienten in der kompletten Remission aus Knochenmarksproben nach. Es konnte auch ein höheres Risiko für ein Rezidiv und ein kürzeres Langzeitüberleben nachgewiesen werden.

Yao et al.⁶¹ wiesen nach, daß der mutmaßlich normale Stammzellpool nicht nur zahlenmäßig verringert ist, sondern auch daß die Stammzellen in vitro auch ein vermindertes Vermögen haben Progenitorzellen hervorzubringen.

Herman et al.⁶² wies bei CD34+ Zellen der ersten Remissionshämatopoese in vitro Defekte in der Hämatopoese, eine verringerte Expansionsfähigkeit und eine erhöhte Zellmortalität bei der Zellkultur nach.

Auch Hokland et al.⁶³ wiesen bei AML-Patienten in Remission Veränderungen bei den Progenitorzellen nach. AML-Patienten zeigten dabei verminderte Zahlen von CFU-GEMM (colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte). Interessanterweise waren aber die Nachfolgezellen [CFU-GM (colony forming unit - granulocyte, monocyte)] zahlenmäßig erhöht.

Wie Marcucci et al.⁶⁴ zeigen konnte, sind zytogenetische Veränderungen zum Zeitpunkt der ersten kompletten Remission bei akuter Leukämie der Erwachsenen gefunden in Knochenmarksproben verlässliche Vorhersageparameter für kurzes rezidivfreies Überleben, kurzes Gesamtüberleben und höherer Rezidivrate. Es konnte auch gezeigt werden, dass zytogenetische Veränderungen im Knochenmarksausstrich der Erstdiagnose nur zum Teil denen in den Stammzellen der Remissionshämatopoese entsprechen.

Während Marcucci et al. sich auf die der zytogenetischen Untersuchung zugänglichen Aberrationen beschränkte, Herman et al. und Yao et al. sich den biologischen Eigenschaften der CD34+ Zellen widmete und Hokland et al. und Martinez et al. die

Anzahlen und zahlenmäßige Verhältnisse von Progenitorzellen-Subpopulationen untersuchten, lag in dieser Studie der Fokus auf subchromosomalen Veränderungen, die mit Mikrosatellitenuntersuchungen aufzudecken sind. Hierbei handelt es sich um LOH und MSI.

Der Nachweis von Veränderungen wie LOH oder MSI setzt entweder eine weite interklonale Verbreitung der Veränderung in einer polyklonalen Zellpopulation voraus (ca. 50% bei LOH, ca. 30% bei MSI) oder das Vorliegen einer oligoklonalen oder monoklonalen Zellpopulation.

Trotz dieser Einschränkung der Nachweisbarkeit konnte zum ersten Mal das Vorkommen von LOH und MSI in CD34+ Zellen der Remissionshämatopoese bei einem Teil der AML-Patienten (19,7% mit Veränderungen, 16,4% mit GIN) festgestellt werden.

Damit erfasst man mit einem Panel von nur acht Primern rund zwei Mal so viele Patienten (8,2% vs. 16,4%), als mit der von Macucci et al. vorgeschlagenen Methode.

Wie in 2.5 beschrieben, wurden die zum zweiten Mal aufgereinigten Zellproben nicht ein zweites Mal auf Reinheit untersucht. Wären nach der zweiten Aufreinigungsprozedur wider Erwarten einzelne Proben noch nicht auf über 80% CD34-Zellanteil angehoben, so ist sogar von einer noch höheren Prävalenz auszugehen, da LOH-Nachweis dann nicht, oder nur bedingt möglich wäre.

Der gelungene Nachweis wirft die Frage nach dem Ursprung dieser Veränderungen auf. Drei Ursachen liegen nahe:

1. Es handelt sich um residuelle leukämische Zellen
2. Es handelt sich um einen Effekt der intensiven Chemotherapie
3. Es handelt sich um einen genetischen „Flurschaden“ bei Patienten mit AML

ad 1.: Die untersuchten Leukaphereseprodukte wurden vor dem Einfrieren im Rahmen der diagnostischen Routine auf residuelle Leukämieblasten untersucht. Dabei wurden keine residuellen Leukämie-Zellen gefunden. Die Oberflächenstruktur der Blasten war aus der Immunphänotypisierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bekannt und wäre somit leicht detektierbar gewesen. Ob durch MACS in einzelnen Fällen CD34-überexprimierende Leukämiezellen bevorzugt aufgereinigt werden, müsste in neuen Studien geprüft werden.

ad 2.: Die simultane Untersuchung einer Kontrollgruppe von 28 Patienten mit dosisintensiven Chemotherapien erbrachte keinen Nachweis von LOH oder MSI in den CD34+ Stammzellen der Hämatopoese. Untersucht wurde dabei von allem der Einfluss

der Anthrazykline, die bei 27 der 28 Patienten Anwendung fanden. Da die Kombination Anthrazykline und Nukleosidanaloga nur bei AML zur Standardtherapie gehört, war dies die bestmögliche Adaptation an die untersuchte Gruppe.

ad 3.: Die Tatsache der Nachweisbarkeit von LOH und MSI, welche eine relativ reine Zellpopulation voraussetzen, spricht für Oligoklonalität der Stammzellen der Remissionshämatopoese bei AML und damit für eine nicht „normale“ Hämatopoese, selbst wenn morphologisch die Knochenmarksausstriche „normal“ wirken. Auch die biologischen Funktionseinschränkungen, wie sie von Herman et al. festgestellt wurden, deuten in Richtung einer nicht „normalen“ Stammzellenpopulation bei AML. Die hier gefundenen genetischen Alterationen weisen also deutlich auf eine Remissionshämatopoese mit genetischen Defekten hin. Möglicherweise könnte man hier von einer neuen Form von Myelodysplasie sprechen, die nur genetisch, nicht aber morphologisch abzugrenzen ist.

Interessanterweise waren die 47 verfügbaren Knochenmarksausstriche zum Zeitpunkt der ersten Remission frei von GIN. Darunter befanden sich auch 7 (von 10) der GIN+ Patienten. Die fehlende Nachweisbarkeit von GIN in den Knochenmarksausstrichen könnte darauf hindeuten, dass sich die ausgereiften Zellen aus einer polyklonalen Subpopulation der CD34+ Zellen rekrutieren, wobei der gesamte Stammzellpool von wenigen Klonen dominiert wird. Somit hätten GIN+ Zellen einen Selektionsvorteil, aber einen Differenzierungsnachteil.

Auswirkung der gefundenen GIN auf das EFS

Um die klinische Relevanz von GIN und damit die Auswirkung auf das EFS zu prüfen, wurden die Patientencharakteristika der untersuchten Patientenkohorte mit denen von größeren Patientengruppen verglichen. Es stellte sich dabei eine im Wesentlichen ähnliche Verteilung von Alter, FAB-Subklassifikation, zytogenetischem Risiko, LDH-Spiegel, Blastenanteil zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und Ansprechen auf die Induktionstherapie heraus.

In einem nächsten Schritt wurde die Unabhängigkeit des neuen putativen Risikofaktors „GIN“ von den bekannten Faktoren Alter, LDH und zytogenetisches Risiko untersucht. GIN zeigte sich beim exakten Fisher-Test als unabhängig von den genannten Faktoren.

Weiterhin wurde die Auswirkung der genannten Faktoren auf das EFS geprüft, um die Annahme der Repräsentativität der untersuchten Patientengruppe zu unterstützen.

Dabei zeigte sich Gültigkeit des Risikofaktors Alter in der Kaplan-Meier Analytik ($p=0,022$). Bei der Untersuchung des Risikofaktors zytogenetisches Risiko wurde Signifikanz mit dem log rank-Test nur knapp verfehlt ($p=0,053$), jedoch mit Wilcoxon-Test sicher erreicht ($p=0,0056$).

Die Auswertung der Daten bezüglich LDH erbrachte ein im ersten Anschein verblüffendes Ergebnis: Ein hoher LDH-Wert scheint in der untersuchten Patientengruppe ein protektiver Faktor mit einem längeren EFS zu sein ($p=0,0346$). Dies widerspricht den Erkenntnissen aus großen AML-Studien. Diese beziehen sich aber in der Regel auf Patientengruppen, die nur de-novo AML einschlossen. In der vorliegenden Arbeit wurde aber bewusst unausgesuchtes Patientengut verwendet, die auch sekundäre AML bei bevorstehenden MDS beinhaltet. Da diese Patienten eher eine periphere Verminderung aller Zellreihen bei niedrigen medullären Blastenanteilen zeigen, weisen sie auch generell niedrigere LDH-Werte auf als Patienten mit de-novo AML. Sekundäre AML mit relativ niedrigen LDH-Werten ist aber bekanntermaßen mit schlechter Prognose vergesellschaftet, so dass sich dieses auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnis erklären lässt.

Aus dem bisher gesagten erschließt sich, dass es sich bei den untersuchten Patienten um eine Gruppe aus unausgelesenen, der Zusammensetzung von größeren AML-Gruppen entsprechenden Patienten handelt.

Kann der neue Prognosefaktor GIN in den Stammzellen der Remissionshämatopoese nun in der Risikotriage weiterhelfen? Die Kaplan-Meier Analytik erbrachte für GIN positive Patienten ein signifikant schlechteres EFS ($p=0,0437$). Das mittlere EFS unterschied sich auch in einem klinisch relevanten Maß (14,7 vs. 61,3 Monate).

In einem Vorhersagemodell, welches mittels Cox Regression mit schrittweisem Einschluss ermittelt wurde, war GIN mit einer Hazard Ratio (HR) von 2,397 ein starker Risikofaktor für ein frühes Event ($p=0,031$) und damit vergleichbar mit der Zugehörigkeit zur KaryoGruppe mit zytogenetischem Risiko 3 (HR 2,683) und Zugehörigkeit zur Altersgruppe > 50 Jahre (HR 2,674).

Die Deutlichkeit der Ergebnisse spricht bei der kleinen betroffenen Gruppe (10/61) und der relativ kleinen Gesamtgruppe für Robustheit des Prognosefaktors „GIN“.

Einzuräumen ist, dass die Festlegung der Kriterien für GIN (Zwei LOH, ein MSI oder LOH bei D8S559) zu einem gewissen Maß willkürlich erscheinen kann. Andererseits belegen der Einfluss auf das EFS in der Kaplan-Meier Analytik und sogar in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse die Richtigkeit dieser Kriterien. Ob die gefundenen Kriterien bei Erweiterung des Primerspektrums und Vergrößerung der untersuchten Patientenzahl modifiziert werden müssen, bleibt zu klären.

Für die Zukunft wird eine Suche nach weiteren relevanten Genorten zur Verfeinerung der Definition von GIN nötig sein. Auch sollte die Aussagekraft der gefundenen Definition an größeren Patientengruppen überprüft und modifiziert werden.

5. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist bezüglich der Langzeitprognose eine heterogene Erkrankung. Alter, Leukozytenzahl, zytogenetische Befunde, LDH bei Diagnosestellung und andere klinische, morphologische und laborchemische Befunde dienen als prognostische Marker.

Zentrales Element der Therapie der AML ist eine hochdosierte Chemotherapie zur Induktion einer Remission. Es folgen weitere Chemotherapien zur Konsolidierung und Erhaltung der Remission. Bei prognostisch ungünstigen Formen der AML kann nach Erreichen der ersten kompletten Remission eine allogene Stammzelltransplantation angeschlossen werden. Mit dieser Therapie ist das beste Langzeitüberleben zu erreichen, jedoch unter Inkaufnahme von relevanter therapieassoziierter Morbidität und Mortalität. Belastbare Prognosefaktoren sind daher essentielle Entscheidungshilfen in der AML-Therapie.

Die bisher bekannten Prognosefaktoren haben vor allem den Zeitpunkt der Erstdiagnose der AML im Blick. In der vorliegenden Arbeit wird der Zeitpunkt der ersten Remission untersucht. Morphologisch normale Knochenmarksausstriche bzw. Vollblut in der ersten Remission können nach Stand der Forschung keine zusätzlichen Hinweise auf das rezidivfreie Überleben geben.

In dieser Arbeit wurde die Remissionshämatopoese auf Stammzelebene untersucht. Untersuchungsmaterial waren hämatopoetische Stammzellen aus Leukaphereseprodukten von unausgelesenen AML-Patienten (n=61) in kompletter Remission. Die Stammzellgewinnung erfolgte mittels magnetischen CD34-Antikörpern (MACS-System). Es wurden PCR-Untersuchungen von Genorten, die bekanntermaßen Instabilitäten bei hämatologischen Erkrankungen oder soliden Tumoren aufweisen können (h-MSH2, APC, D7S486, c-Met, ETO, MLL, BRCA1, p53) durchgeführt. Ziel der Analyse war Bestimmung von LOH (loss of heterocycgocity) und MSI (Mikrosatelliteninstabilität).

Als neuer Prognosefaktor wurde „GIN“ (genetisch instabil) gefunden. Als Definition von GIN wurde MSI an mindestens einem Genort, LOH an mindestens zwei Genorten oder LOH am AML-typischen ETO-Genort festgelegt.

GIN zum Zeitpunkt der Remission konnte bei 10 Patienten (16,4%) in den CD34-angereicherten Aphareseprodukten gefunden werden. In Knochenmarksausstrichen zum selben Zeitpunkt war GIN nicht nachweisbar.

GIN stellte sich als unabhängig von Alter, LDH und zytogenetischem Risiko bei Erstdiagnose heraus. Die Auswirkung auf das EFS („event free survival“) wurde untersucht. Als „event“ wurde ein Rezidiv oder MDS gewertet. GIN pos-Patienten haben in dieser Studie ein signifikant schlechteres EFS (14,7 vs. 61,3 Monate, $p=0,04$). GIN ist mit einer Hazard Ratio von 2,39 ein starker Risikofaktor.

GIN in den Stammzellen der Remissionshämatopoese bietet sich somit als neuer Risikofaktor bei der Risikostratifizierung und Therapieentscheidung bei AML an.

6. Literaturverzeichnis

-
- ¹ **Herold G. et al.:** Innere Medizin. 2004
- ² **Albitar M., Manshouri T., Shen Y., et al.:** Myelodysplastic syndrome is not merely “preleukemia”. *Blood*. 2002; 100(3):791-798
- ³ **Deschler B., Lubbert M.:** Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006; 107(9):2099-2107
- ⁴ **Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., et al.:** Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976; 33:451-458
- ⁵ **Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., et al.:** World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia. *Journal of Clinical Oncology*. 1997; 17:3835-3849
- ⁶ **Haferlach T., Kern W., Schoch C., et al.:** A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*. 2004; 89(4):408-418
- ⁷ http://de.wikipedia.org/wiki/Akute_myeloische_Leuk%C3%A4mie
- ⁸ **Haferlach T., Schoch C., Löffler H. et al.:** Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21:256-265
- ⁹ **Shipley J.L., Butera J.N.:** Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*. 2009; 37(6):649-658
- ¹⁰ **Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., et al.:** Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*. 1982; 51(2):189-199
- ¹¹ **Rogge T., Niemeyer C.M.:** Myelodysplastic Syndromes in Childhood. *Onkologie*. 2000; 23:18-24
- ¹² **Raza S., Dar S., Andric T., et al.:** Biologic characteristics of 164 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 1999; 33:281–287
- ¹³ **Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., et al.:** World Health Organization of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory

committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology* 17 (1999), 3835-3849

¹⁴ **List A., Dewald G., Bennett J., et al.:** Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(14):1456-1465

¹⁵ **Lengauer Ch., Kinzler K.W., Vogelstein B.:** Genetic instabilities in human cancers; *Nature*. 1998;396:643-649

¹⁶ <http://de.wikipedia.org/wiki/Mikrosatelliteninstabilit%C3%A4t>

¹⁷ **Hamelin R., Chalastanis A., Colas C., et al:** Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers; *Bulletin de Cancer*. 2008; 95(1):121-132

¹⁸ **Knudson A.:** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1978; 68(4):820–823

¹⁹ **Niederacher D., Beckmann M.W.:** Bedeutung der LOH-Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen. *medizinische Genetik*. 1998; 10:256-258

²⁰ **Krskova-Honzatkova L., Cermak J.:** Loss of heterozygosity and heterogeneity of its appearance and persisting in the course of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2001; 25: 45-53

²¹ **List A.F., Vardiman J., Issa J.P., et al.:** Myelodysplastic syndromes. *Hematology. American Society of Hematology Education Program Book*. 2004; 297-317

²² **Sheikhha M.H., Tobal K., Liu Yin J.A.:** High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*. 2002; 117(2):359-365

²³ **Oda S., Zhao Y., Maehara Y.:** Microsatellite instability in gastrointestinal tract cancers: a brief update. *Surgery Today*. 2005; 35(12):1005-1015

²⁴ **Nunn J., Nagini S., Risk J.M., et al.:** Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*. 2003; 39(2):115-129

²⁵ **Zhu Y.M., Das-Gupta E.P., Russell N.H.:** Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukemia. *Blood*. 1999; 94(2):733-740

²⁶ **Nakamura Y., Nishisho I., Kinzler K.W., et al.:** Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symposium*. 1991; 22:285-292

-
- ²⁷ **Takahashi S., Shan A.L., Ritland S.R., et al.:** Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Research*. 1995; 55(18):4114-4119
- ²⁸ **Liang H., Fairman J., Claxton D.F., et al.:** Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1998; 95(7):3781-3785
- ²⁹ **Champeme M.H., Bieche I., Beuzelin M., et al.:** Loss of heterozygosity on 7q31 occurs early during breast tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995; 12(4):304-306
- ³⁰ **Kuniyasu H., Yasui W., Yokozaki H., et al.:** Frequent loss of heterozygosity of the long arm of chromosome 7 is closely associated with progression of human gastric carcinomas. *International Journal of Cancer*. 1994; 59(5):597-600
- ³¹ **Borset M., Seidel C., Hjorth-Hansen H., et al.:** The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leukemia and Lymphoma*. 1999; 32(3-4):249-256
- ³² **Mrozek K., Bloomfield C.D.:** Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology. American Society of Hematology Education Program Book*. 2006: 169-177
- ³³ **Abdou S.M., Jadayel D.M., Min T., et al.:** Incidence of MLL rearrangement in acute myeloid leukemia, and a CALM-AF10 fusion in M4 type acute myeloblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2002; 43(1):89-95
- ³⁴ **Webb J.C., Golovleva I., Simpkins A.H., et al.:** Loss of Heterozygosity and Microsatellite Instability at the *MLL* Locus Are Common in Childhood Acute Leukemia, but not in Infant Acute Leukemia. *Blood*. 1999; 94:283-290
- ³⁵ **Lorenzo Bermejo J., Hemminki K.:** Risk of cancer at sites other than the breast in Swedish families eligible for BRCA1 and BRCA2 mutation testing. *Annals of Oncology*. 2004; 15:1834
- ³⁶ **Lane D.P.:** p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; 358: 15-16
- ³⁷ **<http://de.wikipedia.org/wiki/P53>**
- ³⁸ **Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al.:** Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine* 1985, 103, 620-625
- ³⁹ **Harris N., Jaffe E., Diebold J. et al.:** World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical

Advisory Committee Meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *Annals of Oncology*. 1999;10(12): 1419-1432

⁴⁰ **N.N.**, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects Original Article Series*. 1985;21(1):1-117

⁴¹ **Reichle A., Rothe G., Krause S., Zaiss M., Ullrich H., Schmitz G., Andreessen R.:** Transplant characteristics: minimal residual disease and impaired megakaryocytic colony growth as sensitive parameters for predicting relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1999; 13(8):1227-1234

⁴² **Cheson B.D., Cassileth P.A., Head D.R., et al.:** Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1990; 8(5):813-819

⁴³ **Miltenyi S., Muller W., Weichel W., et al.:** High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990; 11:231-238

⁴⁴ **http://www.miltenyibiotec.com/en/NN_1146_Basic_principle.aspx**

⁴⁵ **Fulwyler M.J.:** Flow cytometry and cell sorting. *Blood cells*. 1980; 6(2):173-184

⁴⁶ **Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M., et al.:** The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *Journal of Hematotherapy* 1996; 5:213-226

⁴⁷ **Gratama J.W., Keeney M., Sutherland D.R.:** Enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. *Current Protocols in Cytometry*. 1999 Supplement 8:Unit 6.4

⁴⁸ **Keeney M., Chin-Yee I., Weir K., et al.:** Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Clinical Cytometry*. 1998; 34:61-70

⁴⁹ **Mullis K., Faloona F., Scharf S., et al.:** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986; 51:263-273

⁵⁰ **Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., et al.:** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 1988; 239:487–491

⁵¹ **Kwok S., Higuchi R.:** Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989; 339:237-238

⁵² **Woenckhaus M., Grepmeier U., Werner B., et al.:** Microsatellite analysis of pleural supernatants could increase sensitivity of pleural fluid cytology. *Journal of Molecular Diagnostic*. 2005; 7(4):517-524

-
- ⁵³ **O'Connor D.P., Kay E.W., Leader M., et al.:** A high degree of chromosomal instability at 13q14 in cutaneous squamous cell carcinomas: indication for a role of a tumour suppressor gene. *Molecular Patholog.* 2001; 54: 165-169
- ⁵⁴ **Scholes A.G., Liloglou T., Maloney P., et al.:** Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3, 9, 13, and 17, Including the Retinoblastoma Locus, in Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2001; 42:2472-2477
- ⁵⁵ **Haferlach T. , Kern W., Schoch C., et al.:** A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *haematologica.* 2004; 89:408-418
- ⁵⁶ **Kaplan E.L., Meier P.:** Nonparametric estimation from incomplete observations. *American Statistic Association Journal.* 1958; 53:457-481
- ⁵⁷ **Cox D.R.:** Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society, Serie B* 1972; 34:187–220
- ⁵⁸ **Fisher R.A.:** On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society.* 1922; 85(1):87-94
- ⁵⁹ **Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D.:** The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2003; 101(7):2895-2896
- ⁶⁰ **Martínez A., San Miguel J.F., Vidriales M.B., et al.:** An abnormal CD34+ myeloid/CD34+ lymphoid ratio at the end of chemotherapy predicts relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Cytometry.* 1999; 15; 38(2):70-75
- ⁶¹ **Yao M., Bouchet S., Harnois C., et al.:** Quantitative and qualitative alterations of long-term culture-initiating cells in patients with acute leukaemia in complete remission. *British Journal of Haematology.* 1998; 103(1):124-128
- ⁶² **Herman P., Van Bockstaele D.R., Ferrant A., et al.:** In vitro evaluation of the haemopoietic defect of CD34+ cells from patients with acute myeloid leukaemia in first remission. *British Journal of Haematology.* 1999; 106(1):142-151
- ⁶³ **Hokland P, Nielsen B, Ellegaard J, et al.:** Myeloid progenitors in remission bone marrow in patients with malignant blood diseases: clues for slow hematopoietic regeneration after ABMT? *Journal of Hematotherapy.* 1996 ;5(3):279-288
- ⁶⁴ **Marcucci G., Mrozek K., Ruppert A.S., et al.:** Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *Journal of Clinical Oncology.* 2004; 22(12):2410-2418

7. Lebenslauf

Name Michael Raffer

Geburtsdatum 26.04.1976

Geburtsort Zwiesel

Anschrift Parkstettener Strasse 21, 94377 Steinach

Ausbildung:

seit 02/2007 klinische Tätigkeit als Assistenzarzt für Anästhesie an der Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Regensburg

09/2000 bis 10/2006 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg,
Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes,
Approbation

08/1999 bis 08/2000 Berufsoberschule Regensburg, allgemeine Hochschulreife

04/1999 bis 08/1999 Tätigkeit als Krankenpfleger am Klinikum Landshut

04/1996 bis 04/1999 Staatliche Krankenpflegeschule Landshut, staatlich
examinierter Krankenpfleger

09/1994 bis 12/1995 Zivildienst in der ambulanten Krankenpflege

08/1993 bis 08/1994 Fachoberschule Deggendorf, allgemeine Fachhochschulreife

08/1988 bis 08/1992 Realschule Viechtach, mittlere Reife

8. Danksagung

Am Ende des langen Weges zur fertigen Dissertation ist es mir ein Bedürfnis allen zu danken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Aller Anfang ist schwer. Also waren auch die Starthilfe bei der Themensuche, das Näherbringen des Themas, die Festlegung der zu untersuchenden Genorte und die Suche nach geeigneten Patienten und Materialien sehr wichtig. Herzlichen Dank gebühren daher Herrn PD Dr. Wolfgang Dietmeier (Institut für Pathologie) und Heike Kassubek (Studienzentrale).

Die Zellaufreinigung mit MACS mit allen ihren Fallstricken hat mir mit großer Geduld Herr Gunnar Müller (MTA) nähergebracht. Herzlichen Dank dafür.

Besonders hervorheben möchte ich auch Fr. Dr. Evelyn Orsó für die unschätzbaren Dienste bei der Reinheitskontrolle der Zellen mit FACS. Zu allen möglichen und unmöglichen Zeiten war sie eine breitwillige Hilfe und hing für die Zellen, die grade fertig waren, auch einmal eine Stunde an die reguläre Arbeitszeit an.

Fr. Heike Bremm (MTA) war eine große Hilfe bei der DNS-Gewinnung und auch eine stetige Motivationshilfe und Garantin eines angenehmen Laborklimas.

Trotz Verunreinigung und Fehlbeladungen bei PCR und Fragmentlängenanalyse kam ich letztendlich zu guten und qualitativ einwandfreien Ergebnissen. Dies ist auch ein Verdienst von Kerstin Meier und Stefanie Götz (MTAs).

Herr Dr. Stephan Schwarz (Institut für Pathologie) war ein geduldiger und sachkundiger Ratgeber in Bezug auf methodisches, wissenschaftliches Arbeiten und Statistik. Schönen Dank dafür!

Herr Prof. Albrecht Reichle war als Gesamtbetreuer der Arbeit ein steter Quell an Ideen und Lösungsmöglichkeiten. Er führte mich in das Thema ein, stellte die nötigen Kontakte her und war mit seiner schier unendlichen Geduld, mit seinem Überblick und mit den nötigen Motivationsschüben für das Gelingen der Arbeit unentbehrlich.

Ebenso erwähnen möchte ich die kritischen Probeleser und unermüdlichen Motivatoren Ingrid Raith, Tom Schmelmer, Cornelia Karl, meine Eltern und Großmutter.

9. Anlage

Material : PBMC 1e8,
 Column: 2x MS
 original fraction: 0,13 % CD34pos
 positiv fraction: purity 87%, yield 4,14e4

